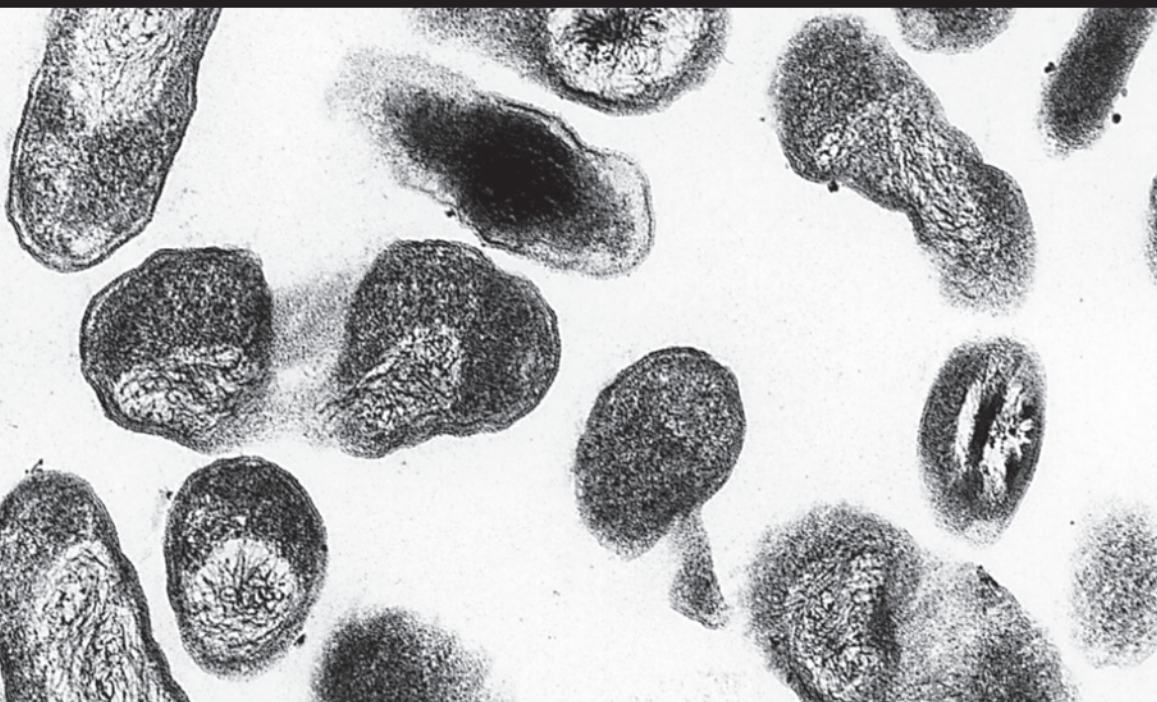


**ENTWICKLUNG EINER REKOMBINANTEN *COXIELLA*
BURNETII-VAKZINE UND ÜBERPRÜFUNG DER
WIRKSAMKEIT IM MAUSMODELL**

SANDRA EBERLING-BENDER



INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2007

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2007

© 2007 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

**Entwicklung einer rekombinanten *Coxiella burnetii*-Vakzine
und Überprüfung der Wirksamkeit im Mausmodell**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Sandra Eberling-Bender

Tierärztin aus Frankenberg/Eder

Gießen 2007

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer
Prof. Dr. K. Doll

Tag der Disputation: 07. Dezember 2007

Meinen Eltern

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Tyczka, J., Eberling, S., Baljer, G.

Immunization experiments with recombinant *Coxiella burnetii* proteins in a murine infection model.
Annales of the New York Academy of Sciences. 2006. Volume 1063: 143-148.

Tyczka, Eberling-Bender, Baljer

Überprüfung der Protektivität rekombinanter *Coxiella burnetii*-Proteine in einem murinen Mausmodell.

Berliner und Münchner Tierärztliche Wochenschrift. 2007. 120(1-2): Seite 10

Eberling, Tyczka, Baljer

Antibody response to eight recombinant *Coxiella burnetii* proteins in mice.

International Journal of Medical Microbiology. 2003. 293 (Suppl. No. 36): Seite 166-167.

Diese Arbeit wurde gefördert durch ein Stipendium der

Doktorandenförderung der Animal Health Business Group der Bayer AG.

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VI
1 EINLEITUNG	1
2 LITERATURÜBERSICHT	3
2.1 <i>C. burnetii</i> als Krankheitserreger	3
2.1.1 Taxonomie.....	3
2.1.2 Phasenvariation von <i>C. burnetii</i>	3
2.1.3 Pathogenese	4
2.1.4 Symptomatik von <i>C. burnetii</i> -Infektionen bei Mensch und Tier	5
2.1.5 Epidemiologie	6
2.1.5.1 Wirtsspektrum	6
2.1.5.2 Infektionsquellen	6
2.1.5.3 Übertragungswege.....	7
2.1.5.4 Seroprävalenz	7
2.2 Reaktionen des Immunsystems auf eine <i>C. burnetii</i> -Infektion	8
2.3 <i>C. burnetii</i> -Vakzinen und ihre Wirksamkeit	11
2.3.1 Ganzzellvakzinen (WCV)	11
2.3.1.1 Lebendimpfstoffe	11
2.3.1.2 Inaktivierte Impfstoffe.....	12
2.3.2 Chemo- und Spaltvakzinen	13
2.3.2.1 CMR- und CME-Vakzinen	14
2.3.2.2 TCAE-Vakzinen	14
2.3.2.3 Protein-Vakzinen.....	15
2.3.3 Entwicklung neuerer Q-Fieber-Impfstoffe	15
2.3.3.1 DNA-Vakzinen.....	16
2.3.3.2 Rekombinante <i>subunit</i> -Vakzinen	16
3 MATERIAL UND METHODEN	17
3.1 Materialien	17
3.1.1 Nährmedien, Puffer, Verbrauchsmaterialien und Geräte	17

3.1.2	Bakterienstämme	17
3.1.3	Plasmide	18
3.1.4	Beschreibung der zur Immunisierung genutzten Proteine	20
3.1.5	Impfstoffe	23
3.1.5.1	Q-Vax™	23
3.1.5.2	Rekombinante Proteinvakzine.....	23
3.1.6	Zelllinien	24
3.2	Bakteriologische Methoden.....	24
3.2.1	Bakterienanzucht.....	24
3.2.1.1	Anzucht rekombinanter Bakterienklone auf Selektivnährböden	24
3.2.1.2	Herstellung einer Übernachtskultur	24
3.2.1.3	Anzucht und Induktion von rekombinanten <i>E. coli</i> -Klonen zwecks Expression der rekombinanten Fusionsproteine.....	24
3.2.1.4	Kultivierung und Vermehrung von <i>C. burnetii</i>	25
3.2.2	Herstellung einer <i>C. burnetii</i> -Suspension zur Infektion von Mäusen.....	26
3.2.2.1	Aufreinigung von <i>C. burnetii</i>	26
3.2.2.2	Bestimmung der Partikelzahl einer Coxiellen-Suspension	26
3.2.3	Verfahren zum Nachweis von <i>C. burnetii</i>	27
3.2.3.1	Giménez-Färbung.....	27
3.2.3.2	Quantitative Nachweisverfahren	27
3.3	Proteinanalytik	29
3.3.1	Affinitätschromatographische Aufreinigung der rekombinanten Fusionsproteine	29
3.3.2	Dialyse der in Guanidiniumhydrochlorid-haltigem Puffer vorliegenden aufgereinigten Fusionsproteine gegen Wasser	30
3.3.3	Einengung der Proteinlösung mittels Centricon-Röhrchen YM-10.....	30
3.3.4	Proteinquantifizierung.....	30
3.3.4.1	Proteinquantifizierung mittels BCA* Protein Assay	30
3.3.4.2	Proteinquantifizierung mittels GeneQuant®.....	31
3.3.5	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE).....	31
3.3.6	Western-Blot	31
3.4	Serologische Methoden	32
3.4.1	Nachweis muriner Antikörper mittels Immunoblot	32
3.5	Nukleinsäureanalytik.....	33
3.5.1	Isolierung von genomischer DNA aus murinen Gewebeproben.....	33

3.5.2	Isolierung bakterieller Plasmide	33
3.5.3	Sequenzierung der für die Expression der rekombinanten <i>C. burnetii</i> -Proteine klonierten DNA-Sequenzen	33
3.5.4	Oligodesoxyribonukleotide	33
3.6	Tierexperimentelle Arbeiten	36
3.6.1	Tierhaltung und -verwendung	36
3.6.2	Injektion der Mäuse.....	36
3.6.2.1	Subkutane Injektionen.....	36
3.6.2.2	Intraperitoneale Injektionen	36
3.6.3	Überprüfung der Verträglichkeit und Immunogenität der acht rekombinanten <i>C. burnetii</i> -Proteine im Tiermodell.....	36
3.6.3.1	Immunisierung	36
3.6.3.2	Narkose und Tötung der Mäuse	37
3.6.3.3	Serumgewinnung bei der Maus.....	37
3.6.4	Ermittlung der für das Mausinfektionsmodell einzusetzenden infektiösen Dosis des <i>C. burnetii</i> -Isolates	40
3.6.5	Wirksamkeitsprüfung mit den acht rekombinanten <i>C. burnetii</i> -Proteinen als <i>subunit</i> -Vakzine im Mausinfektionsmodell	41
3.6.5.1	Immunisierung	41
3.6.5.2	Infektion	43
3.6.5.3	Tötung und Sektion der Tiere.....	44
3.7	Datenhaltung und Auswertung.....	45
3.7.1	Bearbeitung und Analyse der Sequenzierungsdaten	45
3.7.2	Statistische Auswertung	45
4	ERGEBNISSE	46
4.1	Sequenzierungsergebnisse für die acht, die rekombinanten <i>C. burnetii</i> -Proteine kodieren- den Inserts	46
4.1.1	<i>comI</i>	46
4.1.2	<i>algC</i>	47
4.1.3	<i>htpB</i>	48
4.1.4	<i>fbp</i>	48
4.1.5	<i>orf410</i>	49
4.1.6	<i>crc</i>	50
4.1.7	<i>mip</i>	51

4.1.8	<i>mucZ</i>	52
4.2	Herstellung der acht rekombinanten <i>C. burnetii</i> -Proteine	53
4.2.1	Expression der Histidin-markierten Fusionsproteine	53
4.2.2	Affinitätschromatographische Aufreinigung der acht rekombinanten Fusionsproteine.....	53
4.2.3	Nachweis und Charakterisierung der Fusionsproteine mittels SDS-PAGE und Westernblot	54
4.3	Überprüfung der Verträglichkeit und Immunogenität der acht rekombinanten <i>C. burnetii</i> -Proteine.....	56
4.3.1	Verträglichkeit der acht rekombinanten <i>C. burnetii</i> -Proteine.....	56
4.3.2	Immunogenität der acht rekombinanten Fusionsproteine	57
4.3.2.1	Nachweis der Serokonversion durch Immunisierung von Mäusen mit einzelnen rekombinanten <i>C. burnetii</i> -Proteinen	57
4.3.2.2	Nachweis der Serokonversion nach Immunisierung von Mäusen mit Kombinationen unterschiedlicher rekombinanter <i>C. burnetii</i> -Proteinen.....	59
4.3.2.3	Nachweis der Kreuzreaktivität von gegen rekombinante <i>C. burnetii</i> -Proteine gerichteten polyklonalen Mäuseseren mit <i>C. burnetii</i> -Ganzzellantigen	65
4.4	Wirksamkeitsprüfung mit den acht rekombinanten <i>C. burnetii</i> -Proteinen als <i>subunit</i> -Vakzine im Mausinfektionsmodell	66
4.4.1	Entwicklung klinischer Parameter nach Infektion mit <i>C. burnetii</i>	66
4.4.1.1	Krankheitsverlauf <i>C. burnetii</i> -infizierter Mäuse.....	66
4.4.1.2	Gewichtsentwicklung der Mäuse	69
4.4.2	Entwicklung der Organgewichte.....	70
4.4.2.1	Milz	70
4.4.2.2	Leber.....	70
4.4.2.3	Nieren.....	71
4.4.3	Bestimmung des <i>C. burnetii</i> -Gehaltes in den Organen der Versuchstiere.....	73
4.4.3.1	Milz	73
4.4.3.2	Leber.....	75
4.4.3.3	Nieren.....	76

5	DISKUSSION	79
5.1	Rekombinante Herstellung der acht <i>C. burnetii</i> -Proteine und ihre Eignung als <i>subunit</i> -Vakzine.....	79
5.1.1	Nutzung von pET-Vektoren als Expressionssystem und Eignung der affinitäts-chromatographischer Aufreinigung.....	79
5.1.2	Eignung der acht rekombinanten <i>C. burnetii</i> -Proteine.....	80
5.1.3	Verträglichkeit der acht rekombinanten <i>C. burnetii</i> -Proteine.....	83
5.1.4	Verträglichkeit bzw. Eignung der Adjuvantien.....	84
5.2	Beurteilung des Tiermodells und der Bewertungsparameter.....	85
5.3	Wirksamkeitsprüfung mit den acht rekombinanten <i>C. burnetii</i> -Proteine als <i>subunit</i> -Vakzine.....	87
5.4	Schlussfolgerung	93
6	ZUSAMMENFASSUNG	94
7	SUMMARY	96
8	LITERATURVERZEICHNIS	97
	ANHANG	111

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

α	Synonym für Signifikanzniveau
α -	<u>Anti</u>
<i>algC</i>	Synonym für <i>orf456</i>
<i>Acc. No.</i>	<i>accession number</i> (Nummer des Datenbankeintrages)
Ag	<u>Antigen</u>
Al(OH) ₃	Aluminiumhydroxid
Ak	<u>Antikörper</u>
Amp	<u>Ampicillin</u>
Amp ₅₀	<u>Ampicillin</u> in einer Konzentration von <u>50</u> µg/ml
<i>Aqua bidest.</i>	<u>Aqua bidestilata</u>
<i>Aqua deion.</i>	<u>Aqua deionisata</u>
AS	Aminosäure
<i>B. subtilis</i>	<u>Bacillus subtilis</u>
BAY R1005	Ajuvans (Glycolipid)
BGM	<u>Buffalo-Green-Monkey-Zellen</u>
BSA	<u>Bovines Serumalbumin</u>
bzw.	<u>beziehungsweise</u>
C	Cystein
°C	Grad Celsius
ca.	<u>circa</u>
CbMip	Translationsprodukt des <i>mip</i> -Gens
<i>C. burnetii</i>	<u>Coxiella burnetii</u>
CH	Schweiz
cm	Zentimeter
<i>comI</i>	Name für ein Gen von <i>C. burnetii</i>
<i>crc</i>	Name für ein Gen von <i>C. burnetii</i>
Crc	Translationsprodukt des <i>crc</i> -Gens
D	Asparaginsäure
d	Tag
<i>dnaJ IA</i>	Name für ein Gen von <i>C. burnetii</i> (Synonym für <i>mucZ</i>)
E	Glutaminsäure

EBE	<u>E</u> inschluss- <u>b</u> ildende <u>E</u> inheiten
EDTA	<u>E</u> thylend <u>i</u> amint <u>e</u> tetraessigsäure
<i>E. coli</i>	<u>E</u> <i>scherichia</i> <u>c</u> <i>oli</i>
ELISA	<u>E</u> nzym- <u>l</u> inked <u>i</u> mmunosorbent <u>a</u> ssay
evtl.	<u>e</u> vent <u>u</u> ell
Fa.	<u>F</u> irma
<i>fbp</i>	Name für ein Gen von <i>C. burnetii</i>
Fbp	Translationsprodukt des <i>fbp</i> -Gens
<i>f. c.</i>	<u>f</u> <i>inal</i> <u>c</u> <i>oncentration</i> (Endkonzentration)
G	Glycin
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
ggf.	gegebenen <u>f</u> alls
<i>groEl</i>	Name für ein Gen von <i>C. burnetii</i> (Synonym für <i>htpB</i>)
GuHCl	<u>G</u> uanidinium <u>h</u> ydro <u>c</u> hl <u>i</u> orid
H	Histidin
h	Stunde
HCl	Salzsäure
H ₂ O	Wasser
<i>htpB</i>	Name für ein Gen von <i>C. burnetii</i>
HspB	Translationsprodukt des <i>htpB</i> -Gens
IHIT	<u>I</u> nstitut für <u>H</u> ygien <u>e</u> und <u>I</u> nfektionskrankheiten der <u>T</u> iere, Universität Gießen
Inf.	<u>I</u> nfektion
inkl.	<u>i</u> nk <u>l</u> usive
<i>i. p.</i>	<u>i</u> <i>ntra</i> <u>p</u> <i>eritoneal</i>
Kap.	<u>K</u> apitel
KCl	Kaliumchlorid
kDa	<u>K</u> ilo <u>d</u> alton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
Km	<u>K</u> ana <u>m</u> ycin
Km ₃₀	<u>K</u> ana <u>m</u> ycin in einer Konzentration von <u>30</u> µg/ml
l	Liter
LB	<u>L</u> uria- <u>B</u> ertani
<i>L. pneumophila</i>	<u>L</u> <i>egionella</i> <u>p</u> <i>neumophila</i>

LPS	<u>L</u> ipopolysaccharid
M	<u>m</u> olar
M	Methionin
mA	<u>M</u> illi <u>a</u> mpere
max.	<u>m</u> aximal
µg	Mikrogramm (10^{-6})
µl	Mikroliter (10^{-6})
µm	Mikrometer (10^{-6})
min	Minuten
min.	<u>m</u> inimal
mind.	<u>m</u> indestens
mg	Milligramm (10^{-3})
<i>mip</i>	Name für ein Gen von <i>C. burnetii</i>
ml	Milliliter (10^{-3})
<i>M. leprae</i>	<u>M</u> ycoplasma <u>l</u> eprae
mm	Millimeter (10^{-3})
mM	Millimolar
<i>M. tuberculosis</i>	<i>M</i> ycoplasma <i>t</i> uberculosis
<i>mucZ</i>	Name für ein Gen von <i>C. burnetii</i>
MucZ	Translationsprodukt des <i>mucZ</i> -Gens
N	Asparagin
NaCl	<u>N</u> atrium <u>c</u> h <u>l</u> orid
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	Dinatriumhydrogenphosphat (mit Kristallwasser)
NaOH	Natronlauge
ng	Nanogramm (10^{-9})
nm	Nanometer (10^{-9})
Nr.	<u>N</u> ummer
OD	<u>o</u> ptische <u>D</u> ichte
o. g.	oben genannt
<i>orf</i>	offenes Leseraster (<i>o</i> pen <i>r</i> eading <i>f</i> rame)
Omp	Translationsprodukt des <i>com1</i> -Gens
<i>orf206a</i>	Name für ein Gen von <i>C. burnetii</i> (Synonym für <i>fbp</i>)
<i>orf410</i>	Name für ein Gen von <i>C. burnetii</i>
Orf410	Translationsprodukt des <i>orf410</i> -Gens

<i>orf456</i>	Name für ein Gen von <i>C. burnetii</i> (Synonym für <i>algC</i>)
<i>P.</i>	<u>P</u> <i>seudomonas</i>
PAGE	<u>P</u> oly <u>a</u> crylamid- <u>G</u> el- <u>E</u> lektrophorese
PBS	Phosphatpuffer (<i>phosphat buffered saline</i>)
PCR	Polymerase Ketten Reaktion (<u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction)
Ph	<u>P</u> hase
<i>p. inf.</i>	<i>post i</i> <u>n</u> fectionem
Pmm	Translationsprodukt des <i>algC</i> -Gens
PP	<u>P</u> robenpuffer
Pr.	Protein
<i>prae inf.</i>	<i>prae i</i> <u>n</u> fectionem
<i>P. aeruginosa</i>	<u>P</u> <i>seudomonas a</i> <u>r</u> u <u>g</u> inosa
Psi	Pfund pro Quadratzoll (<i>pound per square inch</i>)
Q	Glutamin
R	Arginin
rCbMip	<u>r</u> ekombinantes <u>C</u> b <u>M</u> ip
rCrc	<u>r</u> ekombinantes <u>C</u> rc
rHspB	<u>r</u> ekombinantes <u>H</u> sp <u>B</u>
rFbp	<u>r</u> ekombinantes <u>F</u> bp
rMucZ	<u>r</u> ekombinantes <u>M</u> uc <u>Z</u>
rOmp	<u>r</u> ekombinantes <u>O</u> mp
rOrf410	<u>r</u> ekombinantes <u>O</u> rf <u>410</u>
rPmm	<u>r</u> ekombinantes <u>P</u> mm
rPr.	<u>r</u> ekombinante <i>C. burnetii</i> - <u>P</u> roteine
<i>R. quintana</i>	<u>R</u> ochalimea <u>q</u> u <u>i</u> ntana
RT	<u>R</u> aum <u>t</u> emperatur
s.	<u>s</u> iehe
<i>s. c.</i>	<i>sub c</i> <u>u</u> tan
SDS	Duodecylsulfat Natriumsalz (<i>sodium duodecyl sulfate</i>)
sek	Sekunden
s. o.	<u>s</u> iehe <u>o</u> ben
spp.	Subspezies
s. u.	siehe unten
TEMED	N,N,N,N- <u>T</u> etramethylend <u>i</u> amin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

U/min	<u>U</u> mdrehungen pro <u>M</u> inute
u. U.	<u>u</u> nter <u>U</u> mständen
V	Valin
v. a.	<u>v</u> or <u>a</u> llem
Vek.	<u>V</u> ektoren
vergl.	<u>v</u> er <u>g</u> leiche
Vol.	<u>V</u> olumen
v/v	Volumen pro Volumen (<u>v</u> olume per <u>v</u> olume)
WCV	Ganzzellvakzine (<u>w</u> hole <u>c</u> ell <u>y</u> accine)
w/v	Gewicht pro Volumen (<u>w</u> eight per <u>v</u> olume)
x	mal
<i>xth</i>	Name für ein Gen von <i>C. burnetii</i> (Synonym für <i>crc</i>)
Y	Tyrosin
z. B.	<u>z</u> um <u>B</u> eispiel
z. T.	<u>z</u> um <u>T</u> eil

1 EINLEITUNG

Coxiella burnetii (*C. burnetii*) ist ein gramnegatives Bakterium, das sich obligat intrazellulär in Phagolysosomen eukaryotischer Wirtszellen vermehrt. Das Bakterium verursacht die weltweit vorkommende Zoonose Q-Fieber (Ausnahme Neuseeland und Antarktis) (Marrie, 1990) und zeichnet sich durch ein extrem breites Wirtsspektrum aus (Raoult, 2000; Lang, 1990).

Hauptinfektionsquelle für den Menschen ist in Deutschland das Schaf (Hellenbrand, 2001). Infizierte Tiere scheiden den Erreger bei Aborten oder Geburten massenhaft mit der Plazenta, dem Fötus oder Fruchtwasser aus. Trocknen die infizierten Ausscheidungsprodukte ein, entstehen infektiöse Aerosole, die unter geeigneten klimatischen Bedingungen als Infektionsquelle für den Menschen dienen (Lang, 1990; Salmon, 1982). In den vergangenen Jahren konnten solche erregerhaltigen Stäube wiederholt als Auslöser für Q-Fieber-Epidemien in der Bundesrepublik identifiziert werden (Hellenbrand, 2001, Thoms, 1996). Die Übertragung von *C. burnetii* erfolgt dabei zumeist durch Inhalation der oben beschriebenen infektiösen Aerosole (Lang, 1990; Salmon, 1982), die über Distanzen bis zu 18 km verbreitet werden können (Tissot-Dupont, 2004).

Humane Infektionen verlaufen in bis zu 60 % der Fälle subklinisch (Arricau-Bouvery, 2005). Bei klinischen Manifestationen wird zwischen akutem oder chronischem Q-Fieber unterschieden. Akutes Q-Fieber verläuft zumeist als selbstlimitierende, grippeähnliche Erkrankung (Maurin, 1999). Gelegentlich können Komplikationen auftreten (Kagawa, 2003; Madariaga, 2003; Maurin, 1999; Fournier, 1998), die ggf. eine Hospitalisierung der Patienten erforderlich machen. Wesentlich ungünstiger ist die Prognose bei chronischem Q-Fieber, das sich bei ca. 5 % der akut Erkrankten entwickelt (Arricau-Bouvery, 2005) und sich in 60 - 70 % der Fälle als eine therapieresistente Endokarditis manifestiert (Maurin, 1999).

Um die Infektion des Menschen zu verhindern, wäre eine Tilgung des Erregers aus der Nutztierpopulation wünschenswert. Dies ist allerdings trotz präventiver Maßnahmen (Zeckenbekämpfung, Geburtshygiene) aufgrund bestehender Naturherde (Lang, 1990) und der hohen Tenazität des Erregers nicht möglich. Eine Alternative zur Minimierung des Infektionsdrucks für den Menschen bestünde in der Vakzinierung der Nutztiere, um so die Erregerausscheidung zu reduzieren. Des weiteren wird im humanmedizinischen Sektor die Impfung exponierter Personengruppen (Tierärzte, Schlachthofpersonal und Landwirte) angestrebt, um sie effizient vor den Folgen einer *C. burnetii*-Infektion schützen zu können.

Bisherige Versuche zur Etablierung geeigneter Impfstoffe verliefen jedoch wenig erfolgreich. Die für die Anwendung beim Menschen bislang getesteten Vakzinen induzieren zwar eine belastbare Immunität (Ackland, 1994; Ormsbee, 1964). Allerdings führt ihre Applikation zu teilweise

erheblichen, lokalen oder systemischen Nebenwirkungen bei den Impfungen (Ackland, 1994; Ormsbee, 1990). Eine partielle Schutzwirkung der getesteten Vakzinen konnte bei Nutztieren ebenfalls festgestellt werden (Waag, 1997), die Entstehung von lokalen Nebenwirkungen sowie eine Erregerausscheidung infizierter Tiere wurde jedoch durch die bislang zur Vakzinierung der Nutztierpopulation eingesetzten Impfstoffe nicht verhindert. Darüber hinaus ist für die Impfstoffherstellung die massenhafte Vermehrung der hoch virulenten *C. burnetii*-Keime notwendig, woraus sich ein erhebliches Infektionsrisiko ergibt. Entsprechend ist in Deutschland derzeit weder für den veterinär- noch den humanmedizinischen Bereich eine zugelassene Q-Fieber-Vakzine erhältlich.

Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit unter Nutzung moderner molekularbiologischer Methoden ein alternativer Q-Fieber-Impfstoff geprüft. Zur Herstellung dieser rekombinanten *subunit*-Vakzine wurden acht im Genom von *C. burnetii* vorhandene *open reading frames* (*orfs*) aufgrund von Übereinstimmungen mit virulenzassoziierten Genen anderer Bakterienspezies für die Klonierung in *E. coli* ausgewählt. Nach Expression und affinitätschromatographischer Aufreinigung der resultierenden, rekombinanten *C. burnetii*-Proteine wurde deren Eignung als Vakzine unter Verwendung verschiedener Adjuvantien im Tiermodell getestet. Dabei erfolgte sowohl die Untersuchung der immunogenen als auch protektiven Wirkung der rekombinanten *C. burnetii*-Proteine.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 *C. burnetii* als Krankheitserreger

Bei *C. burnetii*, dem Erreger des Q-Fiebers, handelt es sich um ein gram-negatives, obligat intrazelluläres Bakterium, das sich natürlicherweise im Phagolysosom von Makrophagen und polymorphkernigen Leukozyten eukaryotischer Wirte vermehrt (Baca, 1994).

2.1.1 Taxonomie

C. burnetii wird aufgrund phylogenetischer Analysen der Klasse der γ -Proteobakterien zugeordnet und in die Ordnung *Legionellales* eingeteilt (Seshadri, 2003). Diese wiederum besteht aus zwei Familien: Den *Coxiellaceae* und den *Legionellaceae*. Die Familie *Coxiellaceae* untergliedert sich weiter in die Gattung *Coxiella*, deren einziger Vertreter die Spezies *C. burnetii* ist (NCBI).

2.1.2 Phasenvariation von *C. burnetii*

Eine Eigenschaft von *C. burnetii* ist die Fähigkeit zur Antigen-Variation während der Vermehrung in nicht immunkompetenten Wirten, wie dem embryonierten Hühnerei bzw. der Zellkultur (Maurin, 1999). Dieses Phänomen, vergleichbar mit glatten bzw. rauhen Wachstumsformen der *Enterobacteriaceae*, wird als Phasenwechsel bezeichnet und auf den partiellen Verlust von Lipopolysacchariden (LPS) zurückgeführt (Fournier, 1998). Als Ursache wurde eine chromosomale Deletion vermutet (Vodkin, 1986), welche Gene eines O-Antigen *clusters* betrifft, die in die Synthese des im LPS enthaltenen Zuckers Virenose involviert sind (Hoover, 2002). Spätere Untersuchungen zeigten allerdings, dass nicht alle *C. burnetii*-Stämme der Phase II diese Deletion aufwiesen (Thompson, 2003). Daher wird die Theorie einer chromosomalen Deletion als Grundlage der Phasenvariation als nicht mehr haltbar angesehen.

Phase I-Partikel sind die natürlicherweise in infizierten Wirten vorkommenden Formen von *Coxiella*. Sie gelten als hochinfektiös und zeichnen sich durch ein glattes LPS aus, das aus mehr als 16 Alkylketten aufgebaut ist (Toman, 2004). Im Vergleich dazu sind Phase II-Partikel, neben einer abweichenden Proteinzusammensetzung der *C. burnetii*-Membran, durch eine verkürzte LPS-Struktur gekennzeichnet (Amano, 1984). Daraus resultiert eine stark verminderte Virulenz der Phase II-Varianten des Erregers (Moos, 1987), da aufgrund des verkürzten LPS neben dem *leukozyte*

response integrin (LRI, $\alpha_V\beta_3$)-*integrin associated protein* (IAP)-Komplex auch der CR3 ($\alpha_M\beta_2$ Integrin)-Rezeptor in die Bindung an eukaryotische Zellen involviert ist (s. **Kap. 2.1.3**). Dieser Unterschied führt letztlich zu einer beschleunigten Aufnahme der Phase II-Erreger und zur Inaktivierung der Partikel nach dem Eindringen (Capo, 2003; Norlander, 2000; Capo, 1999).

2.1.3 Pathogenese

Im Rahmen einer Infektion nutzt *C. burnetii* spezielle Rezeptoren der eukaryotischen Wirtszelle, um in diese aufgenommen zu werden (Maurin, 1999). Bei diesen Rezeptoren handelt es sich um Integrine wie den LRI ($\alpha_V\beta_3$ Integrin)-IAP-Komplex und CR3 ($\alpha_M\beta_2$ Integrin). Phase I-Partikel werden lediglich über die Bindung an den LRI-IAP-Komplex internalisiert. Aufgrund ihrer LPS-Struktur wird das Eindringen in die Makrophagen über CR3 blockiert. Dies bedingt, dass die Phase I-Partikel lediglich in geringerer Anzahl pro Wirtszelle aufgenommen werden (Capo, 2003; Capo, 1999; Maurin, 1999; Mege, 1997). Im Gegensatz dazu nutzen Phase II-Partikel sowohl den LRI-IAP-Komplex als auch den CR3-Rezeptor. Sie werden sehr effizient und in großer Anzahl von den antigenpräsentierenden Phagozyten aufgenommen (Capo, 2003; Capo, 1999; Maurin, 1999; Mege, 1997). Nach der Internalisierung der Erreger in das Phagosom vollzieht sich die Umwandlung der Kleinzellvarianten (SCV) zu den stoffwechselaktiven Großzellvarianten (LCV). Die Fusion der erregerhaltigen Phagosome mit den Lysosomen wird dabei so lange durch *C. burnetii* verzögert, bis die Transformation der SCV in die LCV abgeschlossen ist (Howe, 2000). Darüber hinaus sind Phase I-Partikel in der Lage, die mikrobioziden Mechanismen der Phagozyten partiell zu unterlaufen, indem sie die phagolysosomale Reifung beeinflussen (Ghigo, 2002). Somit beteiligt sich *C. burnetii* aktiv an der Biogenese der replikativen Phagolysosomen und sichert auf diese Weise das intrazelluläre Überleben (Howe, 2003; Ghigo, 2002). Phase II-Partikel können demgegenüber die Reifung der Phagolysosomen nicht beeinflussen und werden folglich von den mikrobioziden Mechanismen wie dem *respiratory burst* der Wirtszellen abgetötet (Capo, 1999; Maurin, 1999; Mege, 1997; Kaufmann, 1993).

Während des weiteren Infektionsgeschehens vereinigen sich die frühen, nur einzelne Coxiellen enthaltenden Phagolysosome allmählich zu einer großen, viele Erreger beherbergenden parasitophoren Vakuole (Norlander, 2000; Hackstadt, 1981). Reife coxiellenhaltige Vakuolen weisen einen pH-Wert von 4,7 bis 5,2 auf, der zur Aktivierung des Metabolismus der Erreger sowie zur Assimilation lebensnotwendiger Nahrungsstoffe essentiell ist (Howe, 2000; Heinzen, 1996; Hendrix, 1984; Hackstadt, 1983). Wird der intravakuoläre pH-Wert durch Zugabe spezifischer Agenzien - z. B. Chloroquine - verändert, wird die Replikation von *C. burnetii* empfindlich gestört (Maurin, 1999; Akporiaye, 1983).

Neben der pH-Toleranz trägt ein Dismutase-Katalase-System zum intrazellulären Überleben der Erreger bei. Dieses System eliminiert sowohl eigene Sauerstoffmetaboliten als auch Metaboliten, die von den Wirtszellen generiert werden (Baca, 1983). Mit den infizierten Makrophagen und polymorphkernigen Leukozyten gelangt *C. burnetii* hämatogen in die verschiedenen Organe. Vor Ort wird eine Entzündung des Gewebes infolge der Abwehrreaktionen des Immunsystems ausgelöst (Concha-Bermejillo, 2001).

2.1.4 Symptomatik von *C. burnetii*-Infektionen bei Mensch und Tier

C. burnetii-Infektionen des Menschen können klinisch inapparent, akut oder chronisch verlaufen. Asymptomatische Verläufe treten bei ca. 60 % der Infektionen auf und können durch eine Serokonversion der Betroffenen nachgewiesen werden (Arricau-Bouvery, 2005; Raoult, 1993). Im Falle einer Erkrankung äußern sie sich durch sehr unterschiedliche Krankheitssymptome (Maurin, 1999). Akutes Q-Fieber hat typischerweise eine zwei- bis sechswöchige Inkubationszeit und manifestiert sich als selbstlimitierende, grippeähnliche Erkrankung, die gekennzeichnet ist durch hohes Fieber, Kopfschmerzen, Myalgien und ggf. einer atypischen Pneumonie (Maurin, 1999; Reimer, 1993). Die Erkrankung heilt in der Regel innerhalb von 7 bis 14 Tagen vollständig aus (Reimer, 1993). In weniger als 2 % der Fälle treten Komplikationen in Form von Pneumonien, Hepatitiden bzw. Meningoencephalitiden auf, die eine Hospitalisierung der Erkrankten erforderlich machen (Concha-Bermejillo, 2001; Raoult, 2000; Reimer, 1993; Tissot Dupont, 1992). Bei einer kleinen Gruppe von Patienten, vermutlich weniger als 5 % aller akut Erkrankten (Arricau-Bouvery, 2005), entwickelt sich ein chronisches Q-Fieber. Dieses manifestiert sich in 60 -70 % der Fälle als therapieresistente Endokarditis. Als eine weitere, chronische Folgeerscheinung humaner *C. burnetii*-Infektionen wird seit einigen Jahren neben einer granulomatösen Hepatitis bzw. einer Osteomyelitis das sogenannte „Post-Q Fever Fatigue Syndrome“ (QFS) diskutiert (Concha-Bermejillo, 2001; Harris, 2000; Fournier, 1998; Kato, 1998). QFS äußert sich als ein Erschöpfungssyndrom, das durch verminderte physische und psychische Leistungsfähigkeit der Erkrankten gekennzeichnet ist. Ein erhöhtes Risiko, chronisches Q-Fieber zu entwickeln, haben vor allem Patienten mit Vorschädigungen der Herzklappen und immunsupprimierte Personen (Raoult, 1993; Raoult, 1990).

Beim Tier verlaufen natürliche Infektionen mit *C. burnetii* meist klinisch inapparent (Lang, 1990). Gelegentlich werden jedoch bei Wiederkäuern Aborte bzw. Frühgeburten und andere Fertilitätsstörungen als Symptome einer Coxiellose beobachtet, die durch eine Vermehrung des Erregers im weiblichen Genitale bedingt sind (Schmeer, 1987). Die Aborte treten ohne vorherige klinische Anzeichen gegen Ende der Trächtigkeit auf. Während die abortierten Feten äußerlich unauffällig erscheinen, weisen infizierte Plazenten fibrinöse Auflagerungen zwischen den Kotelydonen

auf und die Exsudate sind farblich verändert (Arricau-Bouvery, 2005). Darüber hinaus sind auf maternaler Seite Entzündungsreaktionen im Myometrium sowie das Ablösen des Stromas im Bereich der Plazentome zu beobachten (Arricau-Bouvery, 2005).

Untersuchungen belegen, dass die *C. burnetii*-bedingte Abortrate in Schafherden zwischen 3 und 80 % betragen kann (Berri, 2001; Zeman, 1989; Palmer, 1983), auch wenn diese hohen Werte selten erreicht werden (Palmer, 1983). Beim Rind wird als häufigste klinische Manifestation einer *C. burnetii*-Infektion die Metritis diagnostiziert (To, 1998), die in chronischen Fällen zur Infertilität der Tiere und somit zu wirtschaftlichen Verlusten führt.

2.1.5 Epidemiologie

2.1.5.1 Wirtsspektrum

C. burnetii wurde weltweit nachgewiesen (Marrie, 1990). Menschen sowie andere Säugerspezies, Vögel, Reptilien, Arthropoden und Amöben können sich infizieren (Zhang, 2003; Concha-Bermejillo, 2001; La Scola, 2001; Maurin, 1999). Bei einigen dieser Wirte, z. B. Hauswiederkäuer und diverse Wildtierpopulationen, kommt der Erreger enzootisch vor (Arricau-Bouvery, 2005). Diese Wirte stellen somit natürliche Reservoirs für *C. burnetii* dar. Die Reservoirs stehen untereinander über Zecken als Vektoren in Verbindung (Liebisch, 1978). Bei mehr als fünfzig Zeckenspezies konnten natürliche Infektionen mit *C. burnetii* nachgewiesen werden (Kloppert, 2004). Die Infektion der Arthropoden erfolgt im Rahmen der Nahrungsaufnahme. Nach Aufnahme des Erregers durch die Zecke vermehrt sich *C. burnetii* in den Zellen des Mitteldarms bzw. des Magens und wird in hoher Anzahl mit dem Kot ausgeschieden. Nach Austrocknung kann der Kot wiederum als Infektionsquelle für Mensch und Tier dienen. Zudem wird der Erreger auch vertikal in der Zeckenpopulation weitergegeben (Maurin, 1999; Babudieri, 1959), so dass diese ein eigenes Reservoir für *C. burnetii* darstellen.

2.1.5.2 Infektionsquellen

Als Infektionsquellen des Menschen dienen vor allem die im Rahmen von Aborten ausgeschiedenen Geburtsprodukte (Plazenten, Feten und Fruchtwässer) infizierter Haustiere, da diese den Erreger massenhaft enthalten (bis zu 10^9 Bakterien pro Gramm Plazentagewebe) (Fournier, 1998). Aber auch Milch, Urin und Kot infizierter Haustiere, vor allem von Wiederkäuern, müssen prinzipiell als Infektionsquelle für den Menschen in Betracht gezogen werden (Maurin, 1999; Fournier, 1998; Reimer, 1993). Durch Trocknung der Geburtsprodukte bzw. durch Aufwirbelung infektiösen Zeckenkotes (z. B. bei Herdentrieb aus dem Vlies von Schafen) entstehen erregerhaltige Aerosole, die unter geeigneten klimatischen Bedingungen über Distanzen bis zu 18 km verbreitet werden können

(Tissot-Dupont, 2004). So gingen in den letzten Jahren die meisten Q-Fieber-Epidemien in Deutschland von Wiederkäuern, speziell von Schafen, aus (Hellenbrand, 2001). Gelegentlich wurden Q-Fieber-Ausbrüche aber auch von infizierten Katzen, Hunden und Hasen verursacht (Concha-Bermejillo, 2001; Maurin, 1999; Marrie, 1989; Krauss, 1982).

2.1.5.3 Übertragungswege

Die Inhalation erregerrhaltiger Aerosole gilt als wichtigste Transmissionsroute für humane *C. burnetii*-Infektionen (Lang, 1990; Salmon, 1982). In Tierversuchen reichte bereits eine ID₅₀ von 0,6 – 2 Erregern aus, um nach intraperitonealer Applikation eine Infektion auszulösen (Ormsbee, 1978).

Neben der Inhalation wird die alimentäre Aufnahme unpasteurisierter, infizierter Milch als möglicher Übertragungsweg für *C. burnetii*-Infektionen diskutiert. Gemäß den Angaben einiger Autoren soll er allerdings von eher untergeordneter Rolle sein (Fishbein, 1992).

In einigen Fällen wurde auch von einer Transmission des Erregers durch sexuellen Kontakt, in Folge einer Bluttransfusion oder nach perkutaner Inokulation im Rahmen von Labortätigkeiten berichtet (Concha-Bermejillo, 2001; Milazzo, 2001; Marrie, 1990). Obwohl diese Formen der Übertragung extrem selten sind, müssen sie ggf. für die Abklärung der Infektionsquelle einer *C. burnetii*-Infektion in Betracht gezogen werden (Marrie, 1990).

2.1.5.4 Seroprävalenz

Verschiedene seroepidemiologischen Untersuchungen ergaben, dass bestimmte Bevölkerungsgruppen wie Schlachthofpersonal, Tierärzte und Landwirte durch den ständigen Tierkontakt einem erhöhten Infektionsrisiko ausgesetzt sind (Concha-Bermejillo, 2001). In Seroprävalenzstudien mit Blutspendern erwiesen sich ca. 20 % der deutschen Bevölkerung als seropositiv (Hellenbrand, 2001), obwohl die durchschnittliche Inzidenz in den Jahren 1979 - 1999 nur 1,1 Neuerkrankungen pro einer Millionen Einwohner betrug (Hellenbrand, 2001). Die deutliche Diskrepanz zwischen Seroprävalenz und Inzidenz lässt darauf schließen, dass *C. burnetii*-Infektionen aufgrund einer fehlenden oder unspezifischen grippeähnlichen Symptomatik oftmals nicht diagnostiziert werden. Man kann aber auch vermuten, dass möglicherweise mehr als 60 % der Infektionen subklinisch verlaufen oder der Genuss unpasteurisierter Milchprodukte einen größeren Stellenwert bei der Übertragung von *C. burnetii*-Infektion einnimmt als bisher angenommen.

2.2 Reaktionen des Immunsystems auf eine *C. burnetii*-Infektion

Zu Beginn der Infektion steht die angeborene (unspezifische) Immunantwort des Wirtes im Vordergrund, um als erste, unmittelbar verfügbare Abwehrlinie die Vermehrung der obligat intrazellulären Bakterien zu unterbinden (Igietseme, 2003). Die professionellen Phagozyten stellen den Teil des angeborenen, zellulären Immunsystems dar, der im Rahmen einer *C. burnetii*-Infektion als erstes mit dem Erreger konfrontiert ist. Die Erkennung Pathogen-assoziiierter molekularer Strukturen (PAMP) von *Coxiella* erfolgt über die auf der Oberfläche der professionellen Phagozyten lokalisierten Toll-like Rezeptoren (TLR) (Zamboni, 2004; Werling, 2003). Im Zuge des Infektionsgeschehens werden Lipopeptide und -proteine von *Coxiella* bevorzugt durch die TLR2 der Makrophagen und dendritischen Zellen (DC) gebunden (Zamboni, 2004). Die Bindung der *C. burnetii* spezifischen PAMP an die TLR2 induziert die Produktion inflammatorischer Zytokine (IL-12, TNF- α), die Bildung reaktiver Sauerstoff-Zwischenprodukte, die Expression kostimulierender Moleküle und des *major histocompatibility complex* (MHC). Noch während des initialen Kontaktes der Erreger mit der Wirtszelle werden die TLR4 der Phagozyten durch Bindung des LPS von Coxiellen der Phase I aktiviert. Dieser Vorgang induziert eine Reorganisation des Aktin-Zytoskelettes der Phagozyten und steigert auf diese Weise die Internalisierung von virulenten *C. burnetii*-Partikeln über den LRI-IAP-Komplex (Honstette, 2004). Darüber hinaus initiieren die TLR4 mittels Signaltransduktion die Synthese inflammatorischer Zytokine (Honstette, 2004). Somit dienen die TLR sowohl zur Aktivierung der wirtseigenen Abwehrmechanismen als auch zur Vernetzung der unspezifischen mit der adaptiven Immunität (Werling, 2003).

Eine weitere, wichtige Zellpopulation stellen neben den Makrophagen die Natürlichen Killer-Zellen (NK) dar. Sie sind in der Lage, einen Prozess einzuleiten, der als „*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*“ (ADCC) bezeichnet wird (Roitt, 1993). Dabei lysieren NK-Zellen mit Antikörpern markierte, infizierte Zellen, die aufgrund der veränderten Oberflächenstruktur identifiziert werden. Im Fall von *C. burnetii*-Infektionen bedingt dies die Lyse der infizierten Wirtszellen. Auf diese Weise trägt die ADCC *in vivo* zur Begrenzung einer *C. burnetii*-Infektion bei (Baca, 1989). Darüber hinaus produzieren NK-Zellen Zytokine wie IFN- γ , das Makrophagen aktiviert. Diese Aktivierung impliziert eine gesteigerte Phagozytose, eine höhere metabolische Umsatzrate und die Synthese reaktiver und im Zuge der Abwehrprozesse hilfreicher Sauerstoffgruppen seitens der Makrophagen (Kaufmann, 1993). Im Rahmen einer *C. burnetii*-Infektion werden Makrophagen und NKs durch aktivierte γ/δ T-Zellen unterstützt. Diese Lymphozytensubpopulation sezerniert verschiedene Zytokine (Kaufmann, 1993) und besitzt zudem zytolytische Aktivität. Im zeitlichen Verlauf einer Infektion treten diese T-Lymphozyten vor den α/β T-Zellen (adaptive Immunantwort) auf. Die Aufgabe der γ/δ T-Zellen besteht darin, die

immunologische Lücke zwischen der unspezifischen Abwehr (inflammatorische Phagozyten, NK) und dem Beginn der adaptiven Immunantwort (α/β T-Zellen, Antikörper) zu schließen (Kaufmann, 1993). Somit sind sie vor allem an der Aktivierung der Makrophagen in der frühen Infektionsphase vor dem Auftreten der α/β T-Zellen sowie der Lyse infizierter Makrophagen beteiligt.

Zu den humoralen Faktoren der angeborenen Immunantwort zählen das C-reative Protein (CRP) und das Komplementsystem. Im Rahmen der Erregerabwehr unterstützen sie sowohl den zellulären Teil der angeborenen als auch den der speziellen Immunität (Igietsme, 2003). Nach Bindung von CRP an *C. burnetii* löst das Protein eine Aktivierung des Komplementsystems auf dem klassischen Weg aus, was zur Opsonierung der Bakterien führt. Der Prozess trägt schließlich dazu bei, dass *C. burnetii* effizienter bekämpft werden kann.

Eine optimale Schutzwirkung gegen *C. burnetii*-Infektionen wird nur durch das Zusammenspiel der unspezifischen mit der adaptiven Immunantwort erzielt (Zhang, 2004/b). Die Vernetzung beider Anteile der Immunantwort und damit - zeitlich versetzt - die Aktivierung der zellulären Faktoren der spezifischen Immunität wird durch die Makrophagen und DC vermittelt. Neben der Phagozytose eingedrungener Erreger besteht eine weitere Funktion dieser professionellen Phagozyten in der Präsentation antigener Bestandteile von *Coxiella* zusammen mit den auf ihrer Zelloberfläche lokalisierten MHC-Komplexen. Diese Antigenpräsentation induziert das *priming* der naiven α/β T-Lymphozyten, das zur Differenzierung in die MHC-Klasse I-abhängigen CD8⁺-Zellen und die MHC-Klasse II-abhängigen CD4⁺-Zellen führt (Kaufmann, 1993). Im weiteren Infektionsverlauf wird die CD4⁺-T-Zellsubpopulation durch proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-12 und Interleukin-4, die von den antigenpräsentierenden Phagozyten sezerniert werden, zur Ausdifferenzierung in TH₁- bzw. TH₂-Zelltypen veranlasst (Norlander, 2000). Im Falle einer *C. burnetii*-Infektion sind gerade die CD4⁺-Zellen vom TH₁-Zelltyp durch ihre IFN- γ - und TNF- α -Produktion von besonderer Bedeutung bei der mikrobiellen Elimination (Norlander, 2000; Kaufmann, 1993). Das Zytokinprofil induziert die Aktivierung der Makrophagen und DC bzw. die TNF- α vermittelte sowie fas-abhängige Apoptose bereits infizierter Phagozyten (Igietsme, 2003; Norlander, 2000; Dellacasagrande, 1999). In der Konsequenz kommt es zu einer erheblichen Reduktion der Erregerzahl.

Dominiert allerdings eine TH₂-Antwort, sezernieren die CD4⁺-Zellen vermehrt die Zytokine Interleukin-10 (IL-10) und *transforming-growth-factor* (TGF- β 1). Gesteigerte IL-10-Werte unterdrücken die phagosomale Reifung und verhindern so die Elimination der intrazellulären Coxiellen durch die bakteriziden Abwehrmechanismen (Ghigo, 2004). Darüber hinaus induziert IL-10 durch eine gesteigerte Expression der Oberflächenrezeptoren, die in die Phagozytose involviert sind, eine verstärkte Aufnahme von *C. burnetii* (Ghigo, 2001). TGF- β 1 unterdrückt zeitgleich die

bakteriziden Mechanismen der Phagozyten, was die Etablierung der Erreger in der Zelle ermöglicht (Ghigo, 2001). Werden nun im Rahmen eines Infektionsgeschehens IL-10 und TGF- β 1 in erhöhtem Maße sezerniert, ist das Immunsystem nicht in der Lage, *C. burnetii* zu eliminieren. Diese immunologische Situation bedingt die Entstehung einer persistenten Infektion (Concha-Bermejillo, 2001), aus der sich chronisches Q-Fieber entwickeln kann. Um frühzeitig eine adäquate Behandlung eines sich entwickelnden chronischen Q-Fiebers einleiten zu können, wird nach neuesten Erkenntnissen das Vorliegen eines TH₂-dominierten Zytokinprofils (erhöhte IL-10 und TNF- α Werte) bereits als erster diagnostischer Hinweis auf einen chronischen Infektionsverlauf gewertet (Honstetter, 2003).

Während der Infektion wird neben den CD4⁺-Zellen in geringerem Umfang die Bildung von CD8⁺-Zellen festgestellt. Diese zytotoxischen T-Zellen werden durch die Präsentation bakterieller Antigene in Kombination mit dem MHC-Klasse I-Komplex aktiviert. Da dieser Präsentationsweg vorwiegend durch im Zytosol der eukaryotischen Wirtszelle lokalisierte Erreger induziert wird, muss davon ausgegangen werden, dass Antigene der obligat intrazellulären Bakterien im Rahmen der Vermehrung auch ins Zytoplasma der Zielzellen gelangen. Sind CD8⁺-Zellen erst einmal aktiviert, besteht ihre Funktion in der Identifizierung und Lyse infizierter Phagozyten sowie der Freisetzung von IFN- γ (Kaufmann, 1995). Sie tragen somit erheblich zur Eliminierung der Erreger bei.

Im Verlauf einer Infektion erfolgt neben den oben genannten zellulären Abwehrmechanismen der adaptiven Immunität (CD4⁺-, CD8⁺-, NK-Zellen) gleichzeitig die Bildung von Antikörpern. Bei akuten *C. burnetii*-Infektionen werden IgM-Antikörper gegen Phase II-Antigene bereits nach wenigen Tagen nachgewiesen und können bis zu 32 Wochen persistieren (Concha-Bermejillo, 2001). Hingegen treten IgG-Antikörper gegen Phase I-Antigene erst nach 21 Tagen auf (Thiele, 1989), können allerdings bis zu mehreren Jahren, manchmal sogar ein Leben lang nachgewiesen werden (Concha-Bermejillo, 2001). Bei chronischen *C. burnetii*-Infektionen wird dagegen ein hoher Titer von Phase I-Antikörpern der Klasse IgG und IgA festgestellt (Peacock, 1983). Umstritten ist bisher jedoch noch die Rolle, die die humorale Immunantwort für den weiteren Verlauf der Infektion spielt. In früheren Arbeiten wurde vermutet, dass den Antikörpern eine Hauptfunktion bei der Abwehr von *C. burnetii* zukommt. So zeigte Abinanti, dass die Applikation einer Mischung aus Antikörpern und infektiösen Partikeln im Mausmodell keine Infektion nach sich zog (Abinanti, 1957). Verschiedene *in vitro* Studien unterstützten diese Hypothese (Peacock, 1979; Ormsbee, 1978). Neuere Erkenntnisse legen jedoch nahe, dass Antikörper für die Kontrolle einer *C. burnetii*-Infektion *in vivo* nicht essentiell sind. Möglicherweise unterstützen sie allerdings die Elimination des Erregers durch den zellulären Anteil der spezifischen Immunantwort indem infizierte Makrophagen markiert bzw. infektiöse Partikel opsoniert werden (Norlander, 2000). In diesem Zusammenhang erscheinen gerade die Isotypen IgG2a und IgA von Bedeutung (Igietseme, 2003).

2.3 *C. burnetii*-Vakzinen und ihre Wirksamkeit

Zum Schutz vor einer *C. burnetii*-Infektion sind bislang verschiedene Vakzinen entwickelt und auf ihre Wirksamkeit sowohl beim Menschen als auch im Tier getestet worden. Derartige Q-Fieber-Vakzinen sollen exponierte Personengruppen wie Schlachthofpersonal, Tierärzte und Landwirte vor einer Erkrankung und ihren möglichen Spätfolgen schützen. Die Vakzinierung von Hauswiederkäuern dient dem Ziel, die Erregerausscheidung zu unterbinden und typische Krankheitssymptome wie Fruchtbarkeitsstörungen oder Aborte zu verhindern. Damit soll eine Minimierung des Infektionsrisikos für den Menschen sowie die Vermeidung wirtschaftlicher Verluste erreicht werden.

2.3.1 Ganzzellvakzinen (WCV)

2.3.1.1 Lebendimpfstoffe

Aus dem griechischen *C. burnetii*-Isolat „Gritta“ wurde in der ehemaligen Sowjetunion ein Impfstoff aus attenuierten, vermehrungsfähigen Coxiellen hergestellt und auf seine Wirksamkeit in Tierexperimenten bzw. nach oraler Applikation an Freiwilligen untersucht. Diese attenuierte Erregervariante erhielt die Bezeichnung M-44 und zeigte eine stark reduzierte Virulenz in Infektionsversuchen mit Meerschweinchen (Mossienko, 2003; Genig, 1960). In weiteren Untersuchungen gelang es, die Schutzwirkung dieser Phase II-Vakzine in Testinfektionen mit Coxiellen der Phase I und Phase II zu belegen. Allerdings bedingte bereits die Applikation der attenuierten Vakzine die Entstehung milder Läsionen an Herz, Leber und Niere (Johnson, 1977). Darüber hinaus persistierte der Impforganismus innerhalb der Versuchstiergruppen, weshalb grundsätzlich das Risiko einer Erregerreaktivierung bestand. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde auf den Einsatz beim Menschen bzw. auf einen kommerziellen Vertrieb verzichtet (Zhang, 2004/b; Mossienko, 2003; Freylikhman, 2003; Thiele, 1989; Johnson, 1976), zumal die induzierte Immunität derjenigen nach Applikation inaktivierter Vakzinen glich (Ormsbee, 1990).

2.3.1.2 Inaktivierte Impfstoffe

Zeitgleich mit der Wirksamkeitsprüfung von „M-44“ erfolgten zahlreiche Versuche, inaktivierte Coxiellen der Phase I und Phase II als Impfstoffe zu nutzen. Die Inaktivierung erfolgte mittels Autoklavieren, Formalin-Behandlung oder Gamma-Bestrahlung (Scott, 1989; Thiele, 1989; Ormsbee, 1964). So waren inaktivierte Phase I-Erreger im Tiermodell in der Lage, eine belastbare Immunität zu induzieren und wiesen dabei eine 100- bis 300-fach höhere Effizienz auf als attenuierte Phase II-Partikel (Ormsbee, 1964). Aus diesen Ergebnissen wurde gefolgert, dass der unterschiedlichen LPS-Strukturen der Bakterien die größte Bedeutung bei der Induktion einer protektiven Immunantwort zukommt (Baca, 1988). Allerdings konnte durch Injektion von isoliertem Coxiellen-LPS kein Impfschutz induziert werden (Amano, 1984). Williams und Waag hingegen erklärten die unterschiedliche Wirksamkeit von Phase I- und Phase II-Ganzzellvakzinen mit Veränderungen der Proteinbestandteile bzw. deren Exposition nach dem Phasenwechsel (Williams, 1991). In der Konsequenz wurden hauptsächlich Präparationen von Phase I-Coxiellen als Impfstoffe erprobt. Diese aus inaktivierten Phase I-Partikeln bestehenden Ganzzellvakzinen induzierten sowohl beim Mensch als auch bei Mäusen eine zelluläre und humorale Immunantwort und verhinderten effektiv das Auftreten klinischer Symptome bei nachfolgenden Infektionen (Zhang, 2004/b; Gajdosova, 1994; Kazar, 1987). Landwirtschaftliche Nutztiere konnten ebenfalls durch Vakzinierung mit Ganzzellvakzinen (*whole cell vaccine*, WCV) der Phase I vor den Symptomen einer Coxiellose, d. h. dem Auftreten von Aborten, geringen Fötusgewichten und chronischer Infertilität, geschützt werden (Souriau, 2003; Schmeer, 1987; Brooks, 1986; Behymer, 1976). Darüber hinaus war es bei naiven Kälbern/Jungtieren durch Vakzinierung mit WCV der Phase I möglich, die Erregerausscheidung *p. inf.* mit der Milch signifikant zu senken (Schmeer, 1987, Biberstein, 1977). Eine vollständige Elimination des Erregers gelang jedoch in keinem der Vakzinierungsversuche, da *C. burnetii* in den Nieren und dem Reproduktionstrakt der vakzinierten Tiere persistierte.

Des weiteren wurde von einigen Autoren diskutiert, dass WCV der Phase I auch immunsupprimierende Eigenschaften besaßen. So induzierte die Applikation der Vakzine eine *in vitro* reduzierte Proliferation splenaler Lymphozyten, wobei die verminderte Ansprechbarkeit der Zellen mit dem Ausmaß pathologischer Organveränderungen korrelierte (Damrow, 1985).

Ein weiterer, erheblicher Nachteil der bislang getesteten inaktivierten Ganzzellvakzinen bestand darin, bei den Impfungen z. T. lokale und/oder systemische Nebenwirkungen auszulösen, v. a. wenn der Impfling bereits Kontakt mit dem Erreger hatte. Als Nebenwirkungen der Vakzinierung musste mit Granulom- und Abszessbildung an der Injektionsstelle bzw. mit der Entstehung von Spleno- und Hepatomegalien sowie Lebernekrosen gerechnet werden (Kazar, 1983/a; Williams, 1982). Um das Auftreten derartiger Nebenwirkungen zu vermeiden, sind verschiedene *screening*-Methoden

(Antikörperbestimmung, Intrakutan- oder *in vitro* Lymphozytenproliferationstests) empfohlen worden, um sensibilisierte Personen zu identifizieren und von der Impfung auszuschließen. In jüngeren Untersuchungen wurde der Lymphozytenproliferationstest zur Überprüfung des Immunstatus bevorzugt, weil die Testergebnisse besser mit einer bestehenden Immunität korrelierten als bei serologischen Verfahren oder Intrakutantests (Izzo, 1988). All diesen *screening*-Methoden ist allerdings stets gemeinsam, dass diese Vorsichtsmaßnahmen sehr kostspielig und zeitaufwendig sind und Impfreaktionen nicht vollständig verhindern können.

Zur Zeit ist lediglich in Australien eine für den Menschen zugelassene WCV der Phase I unter dem Namen Q-VaxTM kommerziell erhältlich. Diese mittels Formalin inaktivierte Ganzzellvakzine wird seit 1989 vertrieben und aus Phase I-Partikeln des *C. burnetii*-Isolates Henzerling hergestellt. Durch die Impfung mit Q-VaxTM wurde das Auftreten von Q-Fieber bei nahezu allen Impfungen in einem Beobachtungszeitraum von fünf Jahren unterbunden (Ackland, 1994; Marmion, 1984).

Im veterinärmedizinischen Bereich finden demgegenüber zwei inaktivierte Coxiellöse-Impfstoffe Verwendung. Eine dieser WCV, Coxevax, besteht aus Phase I-Partikeln eines unbekannten *C. burnetii*-Isolates (Souriau, 2003). Der Impfstoff steht lediglich in Frankreich zur Verfügung und ist dort für den Einsatz bei Wiederkäuern zugelassen. Die Immunisierung mit Coxevax reduzierte sowohl das Auftreten von Aborten als auch die Erregerausscheidung deutlich. Eine Elimination des Erregers bei infizierten Tieren erfolgt allerdings nicht durch die Impfung (Souriau, 2003).

Bei der zweiten Vakzine handelt es sich um einen divalenten Impfstoff, der neben inaktivierten Coxiellen der Phase II auch Chlamydien enthält. Diese kombinierte Vakzine wird als Chlamyvox F.Q. (vormals Abortstop F.Q.) bezeichnet und ist für den Einsatz beim Schaf zugelassen. Durch den Einsatz von Chlamyvox F.Q. kann im Tiermodell eine Serokonversion der Versuchstiere induziert werden. Über die Schutzwirkung der Vakzine liegen widersprüchliche Einschätzungen vor (Arricau-Bouvery, 2005, Döpfer, 1986). Bis heute ist es jedoch nicht möglich, die Reduktion klinischer Symptome eindeutig mit der *C. burnetii*-Komponente des divalenten Impfstoffes in Verbindung zu bringen, da beide Erreger ein ähnliches Krankheitsbild erzeugen (Thiele, 1989). Darüber hinaus wird die Erregerausscheidung durch die Vakzinierung zu keinem Zeitpunkt verhindert (Arricau-Bouvery, 2005; Souriau, 2003, Döpfer, 1986).

2.3.2 Chemo- und Spaltvakzinen

Bereits in ersten Untersuchungen zu Q-Fieber-Vakzinen erwiesen sich mittels verschiedener Extraktionsverfahren (Äther und Wasser; Dimethylsulfoxid) gewonnene *C. burnetii*-Bestandteile im Tierversuch als immunogen (Bell, 1964; Schmadel, 1948).

2.3.2.1 CMR- und CME-Vakzinen

Ab den späten 1970-er Jahren wurde das Chloroform-Methanol-Extraktionsverfahren zur Trennung löslicher und unlöslicher Bestandteile von Phase I-Partikeln eingesetzt. Die Nutzung unlöslicher Bestandteile (*chloroform-methanol residue*, CMR) als Vakzine induzierte weniger Nebenwirkungen als WCV (Kazar, 1983/a; Williams, 1982). Die geringere Toxizität der CMR-Impfstoffe beruhte darauf, dass durch das Extraktionsverfahren der toxische Lipid-A-Anteil entfernt wurde (Ormsbee, 1990). In nachfolgenden Studien konnte die immunogene und protektive Wirkung der CMR-Vakzine in Mäusen, Meerschweinchen und Schafen nachgewiesen werden (Williams, 1992; Fromme, 1987; Brooks, 1986; Williams, 1982). Im Mausmodell wurde sogar eine bessere Schutzwirkung gegen letale *C. burnetii*-Infektionen erzielt als durch eine inaktivierte Phase I-Ganzzellvakzine (Williams, 1986; Williams, 1982). Zudem trat nach Applikation von CMR keine Suppression der Lymphozytenproliferation auf (Williams, 1986), wie sie von Damrow nach Einsatz von WCV beschrieben worden war (Damrow, 1985).

In anderen Studien wurde dagegen eine verminderte Stimulierbarkeit sensibilisierter T-Lymphozyten im Proliferationstest und bei Einsatz hoher CMR-Dosen das Auftreten von Nebenwirkungen beobachtet, die denen nach WCV-Applikation vergleichbar waren (Fries, 1993). Trotz gewisser Vorteile gegenüber einem WCV-Impfstoff wurde die Voruntersuchung der Impflinge dringend angeraten, um die Gefahr von Nebenwirkungen zu minimieren (Fries, 1993).

Die Nutzung der löslichen Extraktionsbestandteilen (*chloroform-methanol extract*, CME) als Impfstoffbasis induzierte im Tierversuch keine belastbare Immunität (Tokarevich, 1993; Williams, 1986). Auf einen weiteren Einsatz dieser Extraktkomponente wurde daher und aufgrund ihrer relativen Toxizität, beruhend auf dem Lipid-A-Anteil, verzichtet.

2.3.2.2 TCAE-Vakzinen

Alternativ zum Chloroform-Methanol-Extraktionsverfahren sollte durch eine Trichloressigsäure-Extraktion (TCAE) von Coxiellen der Phase I impfbedingte Nebenwirkungen vermieden werden. Der lösliche TCA-Extrakt besteht aus einem LPS-Protein-Komplex (Kazar, 1988) und wurde in der ehemaligen Tschechoslowakei bei Personen mit erhöhtem Infektionsrisiko erfolgreich als *C. burnetii*-Vakzine eingesetzt (Kazar, 1982). Weitere Untersuchungen belegten anhand eines signifikanten Anstieges der gegen Phase I-Antigen gerichteten Antikörper die immunogene Wirkung der Chemovakzine. Allerdings konnte auch durch die TCA-Extraktion die Entstehung von lokalen und systemischen Nebenwirkungen bei bereits sensibilisierten Personen nicht verhindert werden (Zhang, 2004/b). Im Vergleich zu WCV-Impfstoffen erwiesen sich TCAE-Vakzinen als weniger effektiv hinsichtlich Umfang, Beginn und Dauer ihrer protektiven Wirkung (Kazar, 1986).

2.3.2.3 Protein-Vakzinen

Im Rahmen der Entwicklung neuer Impfstoffe gegen Q-Fieber erschienen *subunit*-Vakzinen als vielversprechende Kandidaten. Die Identifikation immunogener und zugleich protektiver Proteine erfolgte durch den Einsatz biochemischer, immunologischer und molekularbiologischer Methoden. Bereits 1987 konnte ein immunogenes, Pronase E-resistentes, 27 kDa großes Protein aus dem CMR-Anteil von Phase II-Partikeln isoliert werden (Müller, 1987). Durch Applikation des Proteins ließ sich eine starke Antikörperantwort und Schutzwirkung vergleichbar der von CMR-Phase II-Vakzinen in Versuchstieren erzielen (Schmeer, 1987). Die protektive Wirkung der Protein-Vakzine war jedoch der durch CMR-Phase I-Vakzinen unterlegen (Fromme, 1987).

Drei Jahre später wurde ein 29,5 kDa großes, immunogenes Protein P1 auf der Zelloberfläche, in der Zellwand sowie in Verbindung mit dem Peptidoglykan von LCVs identifiziert. Dieses aufgereinigte Protein zeigte im Tierversuch eine deutliche, protektive Wirkung gegenüber einer letalen Infektionsdosis, die diejenige von isoliertem LPS übertraf. Auffällig war allerdings, dass im Serum P1-immunisierter Mäuse auch Antikörper gegen aufgereinigtes LPS von *C. burnetii* der Phase I festgestellt werden konnten. Aufgrund dessen wurde vermutet, dass protektive Antigene und/oder unspezifische Immunstimulatoren mit dem *C. burnetii*-Protein P1 aufgereinigt wurden und letztlich für die Schutzwirkung der Vakzine mitverantwortlich waren. Darüber hinaus war P1 nicht bei allen Zelltypen während des Entwicklungszyklus von *C. burnetii* nachweisbar (Williams, 1990) und wird daher heute als nur eingeschränkt geeignet für eine *subunit*-Vakzine eingestuft.

1994 konnte ein weiteres immunodominantes, 67 kDa großes Oberflächenprotein identifiziert werden, das sowohl eine zelluläre als auch humorale Immunantwort induzierte (Zhang, 1994). In Vakzinierungsstudien mit Mäusen und Meerschweinchen gelang es, eine protektive Wirkung nachzuweisen (Zhang, 1994).

2.3.3 Entwicklung neuerer Q-Fieber-Impfstoffe

Die bisher an Mensch und Tier getesteten Vakzinen zeichneten sich zwar durch die Induktion einer belastbaren Immunität aus, allerdings führte deren Applikation zur Entstehung von erheblichen, lokalen oder systemischen Nebenwirkungen (Waag, 1997; Ackland, 1994; Ormsbee, 1964). Die Erregerausscheidung wurde zudem durch die bislang zur Vakzinierung der Nutztierpopulation eingesetzten Impfstoffe nicht verhindert. Darüber hinaus erforderte die Herstellung von Impfstoffen bestehend aus Phase I-Partikeln die massenhafte Vermehrung von Coxiellen, woraus sich ein erhebliches Umweltrisiko ergab. Diese Unzulänglichkeiten erforderten somit die Entwicklung alternativer Q-Fieber-Impfstoffe. Diese Impfstoffe sollten neben der Induktion einer zellulären und

humoralen Immunantwort auch bei sensibilisierten Individuen keine Nebenwirkung hervorrufen, um so auf die Durchführung von Voruntersuchung der Impfkandidaten verzichten zu können. DNA- und rekombinante *subunit*-Protein-Vakzinen wurden dabei als vielversprechende Kandidaten angesehen.

2.3.3.1 DNA-Vakzinen

Im letzten Jahrzehnt sind DNA-Vakzinen in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses gerückt. Sie zeichnen sich durch einige Vorteile wie eine kostengünstige Herstellung und Stabilität aus. Zudem besitzen sie die Eigenschaft, eine starke zelluläre Immunantwort, die gerade zur Abwehr obligat intrazellulärer Erreger wie *C. burnetii* erforderlich ist, zu induzieren (Zhang, 2004/b). Die DNA-Vakzinen befinden sich zur Zeit allerdings noch in der Erprobungsphase (Huygen, 2003; Donnelly, 1997). Zur Eignung dieser neuen Generation von Impfstoffe als Q-Fieber-Vakzinen liegen bislang noch keine Berichte vor.

2.3.3.2 Rekombinante *subunit*-Vakzinen

Die Forschungen fokussierten sich zu Beginn der Entwicklung rekombinanter *subunit*-Vakzinen auf die Identifikation und Charakterisierung immunogener Proteine. Vier Proteine, (Com1, P1, Cb-Mip und P28) wurden bisher als mögliche Antigenkandidaten identifiziert (Zhang, 2004/a; Varghees, 2002; Mo, 1995; Hendrix, 1993). Eine belastbare Schutzwirkung konnte jedoch durch die Applikation der einzelnen rekombinanten Proteine nicht erzielt werden (Zhang, 2003). Entsprechend neueren Untersuchungen konnte durch Fusion einzelner rekombinanter Proteine (rP1 und rHspB) die Immunogenität und Protektivität gegenüber einer alleinigen Applikation deutlich gesteigert werden (Li, 2005).

Diese Ergebnisse implizieren, dass die Immunisierung mit rekombinanten *C. burnetii*-Proteinen in Verbindung mit einem geeigneten Adjuvans einen belastbaren Schutz in Versuchstieren erzeugen kann. Die Testung weiterer proteinerger Antigene und geeigneter Protein- bzw. Protein-Adjuvans-Kombinationen stand daher im Fokus der vorliegenden Arbeit.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Materialien

3.1.1 Nährmedien, Puffer, Verbrauchsmaterialien und Geräte

In dieser Arbeit verwendete Nährmedien, Puffer, Verbrauchsmaterialien und Geräte sind im **Anhang** aufgelistet.

3.1.2 Bakterienstämme

Coxiella burnetii:

Tabelle 1: Beschreibung des *C. burnetii*-Isolates.

Isolatbezeichnung	geographische Herkunft	Herkunft	isoliert aus	
			Tierart	Material
Nine Mile RSA493	Montana, U.S.A.	A	Zecke	-

Erläuterung: A = Institut für Virologie, Slowakische Akademie der Wissenschaften, Bratislava

Rekombinante *Escherichia coli*-Stämme:

Tabelle 2: Eigenschaften der verwendeten rekombinanten *E. coli*-Stämme.

Stammbezeichnung	Wirtsstamm	Plasmid	Herkunft
BL21(DE3, pET15b)	BL21(DE3) [Genotyp : F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻), <i>gal dcm</i> (DE3)]	pET15b	IHIT
BL21(DE3, pET24b(+))	BL21(DE3) (Genotyp s. o.)	pET24b(+)	IHIT
BL21(DE3, pTR-14-B)	BL21(DE3) (Genotyp s. o.)	pTR-14-B	IHIT
BL21(DE3, pTR-17-G)	BL21(DE3) (Genotyp s. o.)	pTR-17-G	IHIT

Fortsetzung der Tabelle auf der nächsten Seite

Fortsetzung der **Tabelle 2**

Stammbezeichnung	Wirtsstamm	Plasmid	Herkunft
BL21(DE3, pTR-25)	BL21(DE3) (Genotyp s. o.)	pTR-25	IHIT
BL21(DE3, pHIT-V C8)	BL21(DE3) (Genotyp s. o.)	pHIT-V C8	IHIT
BL21(DE3, pHIT-V C1)	BL21(DE3) (Genotyp s. o.)	pHIT-V C1	IHIT
BL21(DE3, pHIT-V C4)	BL21(DE3) (Genotyp s. o.)	pHIT-V C4	IHIT
BL21(DE3, pHIT-V C5)	BL21(DE3) (Genotyp s. o.)	pHIT-V C5	IHIT
BL21(DE3, pHIT-V C6)	BL21(DE3) (Genotyp s. o.)	pHIT-V C6	IHIT

Erläuterung : IHIT = Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere,
Justus-Liebig-Universität, Gießen

3.1.3 Plasmide

Vektoren und ihre Herkunft:

Tabelle 3: Beschreibung der verwendeten Vektoren.

Vektorbezeichnung	Eigenschaften	Herkunft
pET15b	5708 bp, pBR322 origin, <i>lacI</i> , Amp ^r , T7 Promotor, T7 Transkriptionsstart, T7 Terminator, His-tag Kodierungssequenz	Fa. Novagen, Lugano, CH
pET24b(+)	5309 bp, pBR322 origin, f1 origin, <i>lacI</i> , Kan ^r , T7 Promotor, T7 Transkriptionsstart, T7 Terminator, His-tag Kodierungssequenz	Fa. Novagen, Lugano, CH

Rekombinante Plasmide:**Tabelle 4:** Beschreibung der verwendeten rekombinanten Plasmide (Plasmidkarten s. **Anhang**).

Plasmid-bezeichnung	Vektor	Genbezeichnung	Genbank-eintrag	Größe [bp]	Herkunft
pTR-14-B	pET15b	<i>comI</i>	Z11828 [CBU1910]	289 - 1.047	IHIT
pTR-17-G	pET15b	<i>orf456</i> (<i>algC</i>)	X79075 [CBU0294]	2.766 - 4.136	IHIT
pTR-25	pET15b	<i>htpB</i> (<i>groEl</i>)	M20482 [CBU1718]	459 - 2.117	IHIT
pHIT-V C8	pET15b	<i>orf206a</i> (<i>fbp</i>)	X75356 [CBUA0035]	4.995 - 5.615	IHIT
pHIT-V C1	pET24b(+)	<i>orf410</i>	X75356 [CBUA0010]	23.699 - 24.931	IHIT
pHIT-V C4	pET24b(+)	<i>crc</i> (<i>xth</i>)	AE016960 [CBU0297]	263.915 - 264.694	IHIT
pHIT-V C5	pET24b(+)	<i>mip</i>	U14170 [CBU0630]	64 - 756	IHIT
pHIT-V C6	pET24b(+)	<i>mucZ</i> (<i>dnaJ IA</i>)	L42518 [CBU1873]	98 - 910	IHIT

Erläuterung: IHIT = Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere,
Justus-Liebig-Universität, Gießen

3.1.4 Beschreibung der zur Immunisierung genutzten Proteine

Zur Herstellung der rekombinanten *subunit*-Vakzine wurden acht *open reading frames* (*orfs*) aus dem Genom von *C. burnetii* für die Klonierung in entsprechende Expressionsvektoren und anschließende Überexpression in *E. coli* genutzt. Die Auswahl der *orfs* erfolgte aufgrund von Übereinstimmungen mit virulenzassoziierten Genen anderer pathogener Bakterienspezies. Die Annotierung des Gesamtgenoms von *C. burnetii* (Seshadri, 2003) setzte die ausgewählten *orfs* z. T. in einen neuen organisatorischen bzw. funktionellen Kontext. Die im Folgenden dargestellten Informationen berücksichtigen dies (s. auch **Tabelle 5**).

Omp

Das im Chromosom von *C. burnetii* enthaltene Gen *com1* kodiert das ca. 25,7 kDa große Protein Omp (Burger, 1996; Hendrix, 1993). Bei diesem Protein handelt es sich um ein mit der äußeren Zellmembran assoziiertes, immunreaktives Protein (Burger, 1996; Hendrix, 1993) mit potentiell virulenzsteigernder Funktion. Ein vergleichbares Genprodukt konnte bei anderen Bakterienspezies bislang nicht nachgewiesen werden.

Pmm

Der *orf456* ist bei *C. burnetii* ebenfalls chromosomal lokalisiert und kodiert ein ca. 46 kDa großes Produkt. Die Funktion und zelluläre Lokalisation des korrespondierenden Proteins ist unbekannt, da die Expression bisher nicht nachgewiesen wurde. Für ein analoges, chromosomal kodiertes Protein von *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) konnte allerdings gezeigt werden, dass es sich um ein zentrales Enzym in der LPS- und Alginat-Synthese handelt. Entsprechende *knock out*-Mutanten erwiesen sich im Tierversuch weniger virulent als der Wildtyp (Regni, 2002). Aufgrund der Übereinstimmung von *orf456* mit dem Gen von *P. aeruginosa* wird dieser synonym auch als *algC* bezeichnet.

HspB

Bei HspB handelt es sich um membranassoziiertes, 62 kDa großes Protein, dessen Gen *htpB* ebenfalls chromosomal lokalisiert ist. Entsprechend der aktuellen Annotierung wird *htpB* als *groEL* bezeichnet. Das Genprodukt, ein Chaperonin, fungiert als Hitzeschockprotein und wird in von *Coxiella* gewonnen Membranpräparationen durch Hyperimmunseren verschiedener Spezies erkannt (Vodkin, 1988). Analoge, immunreaktive Antigene wurden auch für *P. aeruginosa*, *E. coli* und verschiedene Spezies von Mykobakterien beschrieben (Vodkin, 1988). Bei diesen handelt es sich ebenfalls um membranassoziierte Hitzeschockproteine (Vodkin, 1988).

Fbp

Der auf dem QpH1-Plasmid verschiedener *Coxiella*-Isolate enthaltene *orf206a* kodiert ein ca. 20 kDa großes Protein, dessen Expression noch nicht nachgewiesen werden konnte. Es gibt Hinweise darauf, dass seine Expression in Abhängigkeit von der Fe^{2+} -Verfügbarkeit erfolgt (Thiele, 1996). Ein entsprechendes, membranassoziiertes Genprodukt wurde für *P. aeruginosa* als Ferripyochelin-bindendes Protein beschrieben, das als Siderophor-Rezeptor und damit als Virulenzfaktor agiert (Farinha, 1993). Aus Übersichtsgründen und in Anlehnung an das analoge Gen bei *P. aeruginosa* wird *orf206a* im Folgenden als *fbp* bezeichnet.

Orf410

Der *orf410* ist in der „Kernregion“ des QpH1- und QpRS-Plasmides sowie den plasmidhomologen Sequenzen des *C. burnetii*-Isolates Scurry lokalisiert und kodiert für ein ca. 42 kDa großes Genprodukt. Über die zelluläre Lokalisation und Funktion des korrespondierenden Proteins ist bisher nichts bekannt. Sequenzvergleiche mit Gendatenbanken wiesen eine Übereinstimmung von *orf410* mit einem *orf* von *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) auf, der eine Integrase/Rekombinase kodiert.

Crc

Das im Chromosom von *C. burnetii* enthaltene *xth* kodiert ein ca. 26 kDa großes Protein. Die Funktion bzw. zelluläre Lokalisation des entsprechenden Proteins ist bislang unbekannt. Für *P. aeruginosa* wurde beschrieben, dass ein ähnliches, chromosomal kodiertes Protein eine zentrale Funktion in der Kontrolle verschiedener kataboler Stoffwechselwege hat und eine sinnvolle Nutzung verschiedener Kohlenstoff- bzw. Energiequellen ermöglicht (Gerischer, 2002; MacGregor, 1996). Verwandte Proteine sind auch von verschiedenen *Enterobacteriaceae* und *Bacillus* spp. bekannt (MacGregor, 1996). Antigene Eigenschaften des Proteins wurden bisher allerdings nicht beschrieben. Die im weiteren verwendete Bezeichnung des *C. burnetii*-Proteins als Crc (*c*atabolic *r*epression *c*ontrol *p*rotein) wurde in Anlehnung an die Funktion der analogen Proteine bei *P. aeruginosa* und den *Enterobacteriaceae* gewählt.

CbMip

Das im Chromosom von *C. burnetii* identifizierte *mip*-Gen kodiert ein in der reifen Form 23,5 kDa großes Protein (CbMip). Es wird angenommen, dass CbMip bei *C. burnetii* entweder membranassoziiert vorliegt oder sezerniert wird (Cianciotto, 1995). Mip-Proteine (*m*acrophage *i*nfectivity *p*otentiator) gehören zu der Familie der FK506-gebundenen Proteine, die den Immunophilinen zugeordnet werden (Mo, 1995). Sie besitzen enzymatischen Charakter und sind von großer Bedeutung für die Interaktion zwischen prokaryotischem Organismus und eukaryotischer

Wirtszelle im Rahmen der Invasion bzw. intrazellulären Etablierung. Neben *C. burnetii* weisen verschiedene andere Bakterienspezies (s. **Tabelle 5**) analoge, membranständige Mip-Proteine auf. Für diese konnte gezeigt werden, dass Mutationen der Mip-Gene eine Reduktion der Invasivität bzw. eine verringerte intrazelluläre Überlebensrate bedingen (Wieland, 2002; Cianciotto, 1995).

MucZ

Bei MucZ handelt es sich um ein ca. 30 kDa großes Protein, das durch das chromosomale Gen *mucZ* kodiert wird. Es wurde vermutet, dass es sich um ein Membranbestandteil von *C. burnetii* handelt (Zuber, 1995). Entsprechend der aktuellen Annotierung wird das *mucZ* Gen aufgrund der Sequenzähnlichkeit mit DnaJ Protein-kodierenden Genen als *dnaJ IA* bezeichnet. Hinweise auf die Funktion von MucZ bei *C. burnetii* gibt es bislang nicht. Die Analogie von MucZ mit DnaJ Proteinen deutet auf eine Funktion als Kontrollelement im Rahmen von metabolischen Prozessen hin (Zuber, 1995). Ein entsprechendes Gen konnte für *E. coli* nachgewiesen werden. Aus einer Überexpression dieses Genes resultiert ein veränderter, schleimiger Phänotyp der entsprechenden *E. coli*-Kolonien. Der dafür verantwortliche Mechanismus konnte bislang nicht vollständig geklärt werden. Es wird vermutet, dass MucZ in *E. coli* regulatorisch über ein DnaK-Chaperone-Komplex eine vermehrte Expression von Kapselbestandteilen durch die Aktivierung von RcsB bewirkt (Zuber, 1995).

Tabelle 5: Beschreibung der zur Immunisierung genutzten rekombinanten Proteine von *C. burnetii*.

Proteinbezeichnung	Genbezeichnung		Größe [kDa]	vermutete Funktion	beschrieben für
	alt	neu			
Omp	<i>com1</i>	<i>com1</i>	25,7	äußeres Membranprotein	<i>C. burnetii</i>
Pmm	<i>algC</i> <i>orf456</i>	<i>algC</i> <i>orf456</i>	~ 46	Phosphomannomutase → LPS-Synthese	<i>C. burnetii</i> <i>P. aeruginosa</i>
HspB	<i>htpB</i>	<i>groEL</i>	~ 62	Hitzeschockprotein	<i>C. burnetii</i> <i>M. tuberculosis</i> <i>M. leprae</i> <i>E. coli</i> + <i>P. spp.</i>
Fbp	<i>fbp</i> <i>orf206</i>	<i>fbp</i> <i>orf206</i>	~ 20	Ferripyochelin-bindendes Protein	<i>P. aeruginosa</i>
Orf410	<i>orf410</i>	<i>orf410</i>	~ 42	Integrase/Rekombinase	<i>B. subtilis</i>
Crc	<i>crc</i>	<i>xth</i>	~ 26	Regulator kataboler Stoffwechselwege	<i>P. aeruginosa</i> <i>Enterobacteriaceae</i> <i>Bacillus spp.</i>

Fortsetzung der Tabelle auf der nächsten Seite

Fortsetzung der **Tabelle 5**

Proteinbe- zeichnung	Genbezeichnung		Größe [kDa]	vermutete Funktion	beschrieben für
	alt	neu			
CbMip	<i>mip</i>	<i>mip</i>	23,5	Interaktion mit eukaryo- tischer Wirtszelle	<i>C. burnetii</i> <i>L. pneumophila</i> <i>Rickettsia</i> spp <i>Ehrlichia</i> spp. <i>R. quintana</i>
MucZ	<i>mucZ</i>	<i>dnaJ IA</i>	~ 30	Regulator der Kapsel- synthese	<i>C. burnetii</i> <i>E. coli</i>

3.1.5 Impfstoffe

3.1.5.1 Q-VaxTM

Als Vakzinierungskontrolle für die Infektionsversuche wurde die Ganzzellvakzine Q-VaxTM, hergestellt von der Fa. CSL Limited, Victoria, Australien, genutzt. Dieser mit Formalin inaktivierte Impfstoff wird seit 1989 vertrieben und basiert auf Phase I-Partikel des *C. burnetii*-Isolates Henzerling. Eine Impfdosis für den Menschen enthält 1×10^9 Partikel (Harris, 2000). Im Rahmen der Infektionsversuche wurden die Mäuse entsprechend den Angaben von Waag mit 1 µg (entspricht ca. 4×10^7 *C. burnetii*-Partikeln) des inaktivierten Isolates immunisiert (Waag, 1997).

3.1.5.2 Rekombinante Proteinvakzine

Affinitätschromatographisch aufgereinigte, rekombinante *C. burnetii*-Proteine und Kombinationen dieser Proteine in Verbindung mit zwei verschiedenen Adjuvantien [Al(OH)₃, BAY R1005] dienten im Rahmen des Immunisierungs- (s. **Kap. 3.6.3**) bzw. der Infektionsversuche (s. **Kap. 3.6.5**) als rekombinante Proteinvakzinen. Nähere Angaben zu den verwendeten Injektionsvolumina, Proteinkonzentrationen, Zusammensetzungen und verwendeten Adjuvantien finden sich dort.

3.1.6 Zelllinien

Tabelle 6: Beschreibung der verwendeten Zelllinie.

Zelllinie	Beschreibung	Ursprung	Herkunft
Buffalo-Green-Monkey-Zellen (BGM)	adhärente, Fibroblasten-artige Zellen	Nierenzellen der afrikanischen grünen Meerkatze	FLI, Jena

Erläuterung: FLI = Friedrich-Loeffler-Institut

3.2 Bakteriologische Methoden

3.2.1 Bakterienanzucht

3.2.1.1 Anzucht rekombinanter Bakterienklone auf Selektivnährböden

Die Anzucht der Transformanten erfolgte unter Verwendung von LB-Agarplatten mit entsprechenden Antibiotikazusätzen (**s. Anhang**). Auf diese Weise wurde lediglich plasmidtragenden Zellen das Wachstum ermöglicht, da nur sie über entsprechende Resistenzgene verfügten. Bei den verwendeten Antibiotika handelte es sich um Ampicillin (50 mg/l) bzw. Kanamycin (30 mg/l).

3.2.1.2 Herstellung einer Übernachtskultur

Drei ml LB-Medium mit Antibiotikuzusatz (Amp₅₀ oder Km₃₀) in einem Reagenzröhrchen wurden mit einer von LB-Agarplatten stammenden Bakterienkolonie beimpft. Die Vermehrung erfolgte in Schüttelinkubatoren bei 37 °C und 180 U/min für ca. 16 Stunden.

3.2.1.3 Anzucht und Induktion von rekombinanten *E. coli*-Klonen zwecks Expression der rekombinanten Fusionsproteine

Als Starterkultur wurden 30 ml LB-Medium mit Antibiotikum im Verhältnis 50:1 mit der Übernachtskultur beimpft und für zwei Stunden aerob bei 37 °C und 180 U/min inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der OD₆₀₀ der Starterkultur, die zur weiteren Verwendung mindestens 0,5 betragen musste. Im nächsten Schritt wurde das Inkubationsvolumens von 30 ml auf 410 ml erhöht und erneut unter den oben genannten Inkubationsbedingungen bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert.

Vor der Induktion der Expression der Fusionsproteine wurden Aliquots von ca. 2 ml als nicht-induzierte Kontrollen entnommen und in sterile Reagenzröhrchen überführt. Die Induktion der Synthese der rekombinanten Fusionsproteine in der verbliebenen Bakteriensuspension erfolgte durch Zusatz von IPTG (*f. c.* 1 mM). Sowohl die nicht-induzierten Kontrollen als auch die induzierte Kultur wurden für weitere 3 Stunden bei 37 °C und 180 U/min inkubiert. Jeweils 1 ml pro Kultur wurde entnommen, in Reaktionsgefäße überführt und bei 4 °C, 10.000 x g für 10 min abzentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes erfolgte die Resuspendierung des gewonnenen Zellpellets in 100 µl 1 x PBS sowie die weitere Lagerung bei -20 °C. Mittels SDS-PAGE (s. **Kap. 3.3.5**) wurde für diese Aliquots überprüft, ob die rekombinanten Proteine exprimiert worden waren.

Die verbliebene Bakteriensuspension wurde für 15 min, bei 4 °C und 8.000 x g zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes erfolgte die Aufbewahrung des Zellpellets für maximal acht Wochen bei -20 °C.

3.2.1.4 Kultivierung und Vermehrung von *C. burnetii*

Das in der vorliegenden Arbeit genutzte *C. burnetii*-Isolat Nine Mile RSA493 (s. **Tabelle 1**) lag im IHIT als infizierte BGM-Zellkultur bei -80 °C vor. Die Kultivierung des Isolates erfolgte nach dem von Arens beschriebenen Verfahren der kontinuierlichen Vermehrung in Buffalo-Green-Monkey-Zellkulturen (Arens, 1983). Die BGM-Zellen wurden auf Deckgläschen in Polystyrolröhrchen, in Vierkant- oder Zellkulturflaschen nach Roux in MEM vermehrt.

Die Infektion der BGM-Zellen in Polystyrolröhrchen erfolgte durch Zugabe von 3 ml eines *Coxiella*-MEM-Gemisches auf den konfluenten BGM-Zellrasen sowie anschließende Zentrifugation im Ausschwingrotor (1 Stunde, 3.000 x g, 37 °C). Die infizierte Zellkultur wurde einige Tage bei 37 °C bebrütet und regelmäßig mikroskopisch kontrolliert. Nach der Zellyse mittels Ultraschall diente diese Kultur als Inokulum für BGM-Zellkulturen in Vierkantflaschen. Der infizierte Zellrasen in den Vierkantflaschen konnte nach ca. sechstägiger Bebrütung abgeschabt werden und diente seinerseits als Inokulum für BGM-Zellen in Zellkulturflaschen nach Roux. Die Überstände dieser Zellkulturen wurden durch alle zwei Tage erfolgende Mediumwechsel geerntet und jeweils bei 30.000 x g im Festwinkelrotor JA-10 für 1 Stunde bei 4 °C abzentrifugiert.

3.2.2 Herstellung einer *C. burnetii*-Suspension zur Infektion von Mäusen

3.2.2.1 Aufreinigung von *C. burnetii*

Durch die Ultraschallbehandlung des in 5 ml 1 x PBS resuspendierten Sediments (s. Kap. 3.2.1.4) erfolgte der Aufschluss der BGM-Zellen. BGM-Zelltrümmer ließen sich durch niedertourige Zentrifugation (500 x g, 10 min, 4 °C) aus der Bakteriensuspension entfernen. Der coxiellenhaltige Überstand wurde anschließend bei 30.000 x g und 4 °C für 1 h zentrifugiert und das entstandene Erregerpellet in 3 ml 1 x PBS resuspendiert.

3.2.2.2 Bestimmung der Partikelzahl einer Coxiellen-Suspension

Um die Konzentration der aufgereinigten Coxiellen in der Erregersuspension zu bestimmen, wurde diese 1:10 bzw. 1:100 mit 1 x PBS verdünnt und je 10 µl der Verdünnungen auf 1 cm² eines Objektträgers ausgestrichen. Nach Antrocknung und Methanolfixierung erfolgte die Giménez-Färbung (s. Kap. 3.2.3.1) der Coxiellen. Die Zählung der Erreger wurde mit dem Mikroskop Ortholux II unter Zuhilfenahme eines Zählokulars als Fünffachbestimmung durchgeführt. Die Berechnung der Partikelkonzentration erfolgte nach folgender Formel:

Partikelkonzentration [*C. burnetii*-Partikel/ml] = $\sum c_i \times M_x \times v_i \times 100$

$\sum c_i$ = Anzahl der gezählten Coxiellen in 100 Kleinstquadraten
(entspricht 1 cm² des Zählgitters)

M_x = Faktor zur Flächenkorrektur des Blickfeldes bei x-facher Vergrößerung

$$M_{(12,5 \times 100\text{-fach})} = \frac{1 \times 10^8 \mu\text{m}^2}{8.100 \mu\text{m}^2} = 12.345,7$$

$$M_{(12,5 \times 63\text{-fach})} = \frac{1 \times 10^8 \mu\text{m}^2}{18.225 \mu\text{m}^2} = 5.487$$

$$M_{(12,5 \times 25\text{-fach})} = \frac{1 \times 10^8 \mu\text{m}^2}{129.600 \mu\text{m}^2} = 771,6$$

v_i = Verdünnungsfaktor der Coxiellen-Suspension

3.2.3 Verfahren zum Nachweis von *C. burnetii*

3.2.3.1 Giménez-Färbung

Der auf einem Objektträger luftgetrocknete Ausstrich der Coxiellen-Suspension wurde eine Stunde mit Methanol fixiert. Die Färbung erfolgte durch sechsinütiges Einwirken der Karbolfuchsin-Gebrauchslösung (s. **Anhang**) sowie Einwirken von Malachitgrün-Färbelösung (2 x 1 min). Vor und nach den Färbeschritten wurde der Objektträger mit *Aqua deion.* gewaschen. Nachdem der Objektträger an der Luft getrocknet worden war, wurde der Ausstrich mikroskopisch ausgewertet.

3.2.3.2 Quantitative Nachweisverfahren

Im Rahmen der Auswertung der Infektionsversuche mit den Mäusen wurde die Anzahl der Coxiellen in Milz, Leber und Niere an zwei definierten Zeitpunkten (Tag 7 und 14 *p. inf.*) quantifiziert. Zu diesem Zweck wurden Milz, Leber und Niere bei der Sektion der Tiere steril entnommen und gewogen (s. **Kap. 3.6.5.3**). Um eine Austrocknung der Organe zu verhindern, wurden die Organoberflächen mit 1 x PBS betropft. Im Anschluss fand die Homogenisation der Organe unter Zugabe von MEM (s. **Anhang**) mit einem Möser und sterilem Seesand zu einer 10 %-igen Suspensionen (w/v) in Petrischalen statt. Zur Sedimentation des Seesandes wurden die Organsuspensionen in 15 ml Reaktionsgefäße überführt. Anschließend konnte der Überstand in frische Reaktionsgefäße pipettiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert werden.

Quantifizierung des C. burnetii-Gehaltes in murinen Organproben mittels quantitativer TaqMan-PCR

Für die Präparation der Gesamt-DNA aus den 10 %-igen Leber- und Nierensuspensionen (s. o.) wurden 250 µl (entspricht 25 mg Organmaterial) als Ausgangsmaterial gemäß den Herstellerangaben in das DNeasy® Tissue Kit eingesetzt (s. **Kap. 3.5.1**). Aufgrund des hohen Nukleinsäuregehaltes von Milzgewebe reichten von den 10 %-igen Milzsuspensionen bereits 100 µl (entspricht 10 mg Organmaterial) für eine DNA-Extraktion aus.

Dankenswerter Weise wurde die anschließende Quantifizierung des Gehaltes an *C. burnetii*-spezifischer DNA in der präparierten Gesamt-DNA mittels TaqMan-PCR durch Mitarbeiter der Sanitätsakademie der Bundeswehr in München durchgeführt.

Quantifizierung der C. burnetii-Lebendkeimzahl in murinen Organproben

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Quantifizierung infektiöser *C. burnetii* in den murinen Gewebeproben mit einer im IHIT etablierten Technik im Mikrotiter-Format.

Zwei Tage nach Aussaat von BGM-Zellen wurde das Zellkulturmedium in den Vertiefungen der 96-*well*-Platten vollständig abgesaugt und durch frisches ersetzt. Gleichzeitig erfolgte die Infektion der Zellkulturen, indem 10 µl der 10 %-igen Coxiellen-Organsuspension (s. o. entspricht 1 mg bzw. 2,5 mg Organmaterial) vorgelegt und umgehend mit 90 µl Zellkulturmedium aufgefüllt wurden.

Nach achtmaligem Durchmischen mit der Mehrkanalpipette erfolgte die Infektion der weiteren Vertiefungen einer Reihe der 96-*well*-Platten in log10-Stufen. Als Negativkontrolle dienten Vertiefungen der Mikrotiterplatten, in denen lediglich ein Mediumwechsel durchgeführt wurde. Nach der Infektion wurden die Platten mit Polyolefin-Klebefolien luftdicht verschlossen. Das Aufzentrifugieren der Erreger erfolgte in einer Stunde bei 1.400 x g und 30 °C in der Eppendorf-Tischzentrifuge 5403. Danach wurden die Mikrotiterplatten bei 37 °C bis zum Mediumwechsel an Tag 7 gelagert. Die Testauswertung erfolgte mittels Phasenkontrastmikroskopie an Tag 12 *p. inf.*. Zu diesem Zeitpunkt konnten bei 400-facher Vergrößerung erregerinduzierte Vakuolen sicher identifiziert werden. Aufgrund ihrer geringen Größe (0,2 - 1 µm) ließen sich die Coxiellen zwar nicht unmittelbar darstellen, aber in den flüssigkeitsgefüllten Vakuolen war eine in Abhängigkeit von ihrem Füllungsgrad strömungsartige bis flirrende Bewegung sehr kleiner, korpuskulärer Bestandteile („Partikeldrift“) erkennbar. Darüber hinaus lagen die typischerweise ovalen bis runden *C. burnetii*-induzierten Vakuolen oftmals in einer nesterartigen Anordnung vor (s. **Abbildung 1**), was bei unspezifischen morphologischen Alterationen nicht gegeben war.

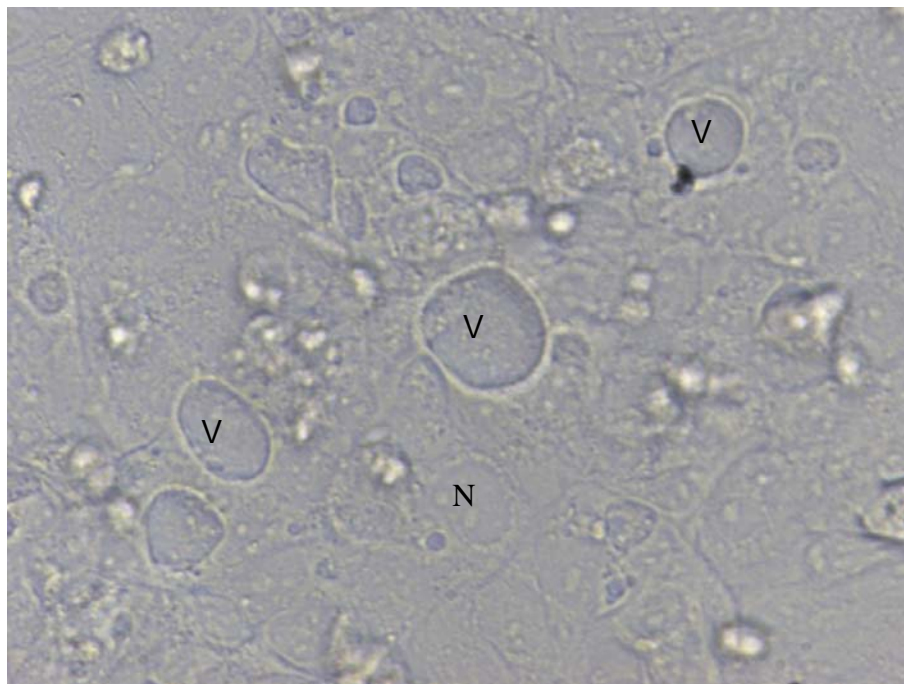


Abbildung 1: Darstellung einer mit *C. burnetii* infizierten BGM-Zellkultur mittels Phasenkontrast in 400-facher Vergrößerung.

V = Vakuole; N = Zellkern

Die Berechnung der Lebendkeimzahl der inokulierten Organsuspension erfolgte in Anlehnung an die Methode nach Spearman und Kerber (Spearman, 1974) nach folgender Formel:

$$\text{Lebendkeimzahl pro ml Organsuspension} = \sum x_i : n \times 100$$

$\sum x_i$	die Summe von $x_1 + x_2 + x_3 + x_4$
x_1, x_2, x_3, x_4	der Kehrwert der letzten, positiven Titrationsstufe (hier: Vertiefungen mit Vakuolen, in denen eine „Partikeldrift“ zu beobachten war) der vier auswertbaren Verdünnungsreihen
n	die Anzahl der pro Vierfachansatz je 10 %-iger Organsuspension ausgewerteten Verdünnungsreihen

3.3 Proteinanalytik

3.3.1 Affinitätschromatographische Aufreinigung der rekombinanten Fusionsproteine

Durch die Klonierung eines Zielgens in den pET15b- bzw. pET24b(+)-Vektor wird die induzierbare Expression eines Fusionsproteins ermöglicht, das am N- bzw. C-terminalen Ende ein sogenanntes His-tag, bestehend aus 6 Histidinresten, trägt. Das His-tag ermöglicht die Isolierung des jeweiligen Fusionsproteins aufgrund einer spezifischen, reversiblen Bindung an zweiwertige Nickelionen. Das Fusionsprotein lässt sich durch Reduktion des pH-Wertes im Elutionspuffer aus dem entstandenen Ni^{2+} -Histidin-Chelat-Komplex lösen, da durch die Verschiebung des pH-Wertes die Bindungsaffinität des His-tag (pK_a von 6,0) an die zweifach positiv geladenen Nickelionen im Säulenmaterial sinkt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte die Proteinaufreinigung unter denaturierend-lysisierenden Bedingungen durch einen Zusatz von 6 M Guanidiniumhydrochlorid zu den Puffern. Dieses Vorgehen war notwendig, da Vorarbeiten gezeigt hatten, dass die Fusionsproteine als Einschlusskörperchen in den Wirtszellen vorlagen. Die Proteinaufreinigung erfolgte nach folgendem Protokoll: Zur Vorbereitung der affinitätschromatographischen Aufreinigung wurde das Zellpellet in Lysispuffer (5 ml/g Pellet; s. **Anhang**) resuspendiert und auf Eis zwischengelagert. Der Aufschluss der Bakterienzellen erfolgte mittels „French[®] Pressure Cell“, wobei die Suspension in drei Durchgängen jeweils einem Druck von 1.000 Psi ausgesetzt war. Das gewonnene Lysat wurde im Anschluss bei 4.500 x g und 4 °C für 30 min zentrifugiert. Fünfzig µl des Überstandes wurden in ein Reaktionsgefäß überführt, mit 50 µl 1 x PBS verdünnt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Das restliche Lysat wurde in frische Reaktionsgefäße umgefüllt und umgehend bei RT weiterverarbeitet. Die Affinitätschromatographie erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers der Ni^{2+} -NTA Agarose, wobei 6 M Guanidiniumhydrochlorid an Stelle von 6 M Harnstoff in den Puffern zur

affinitätschromatographischen Aufreinigung (s. **Anhang**) und das 4-fache Volumen der eingesetzten Ni^{2+} -NTA Agarose als Elutionsvolumen genutzt wurde.

Die Lagerung der Durchflussfraktionen geschah bis zur weiteren Aufarbeitung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.3.2 Dialyse der in Guanidiniumhydrochlorid-haltigem Puffer vorliegenden aufgereinigten Fusionsproteine gegen Wasser

Nach Proteinquantifizierung mittels GeneQuant[®] (s. **Kap. 3.3.4.2**) wurden die proteinhaltigen Eluatfraktionen vereinigt und zur Dialyse in einen Servapor-Dialyseschlauch (1,6 cm Durchmesser) pipettiert. Die Dialyse erfolgte bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ auf einem Magnetrührer über drei Tage gegen eine absteigende Konzentrationen von 6 M, 4 M bzw. 2 M Guanidiniumhydrochlorid in Wasser und letztlich gegen *Aqua deion.*. Die erhaltenen Proteinsuspensionen wurden anschließend in frische Reaktionsgefäße umgefüllt.

3.3.3 Einengung der Proteinlösung mittels Centricon-Röhrchen YM-10

Die Einengung der dialysierten Proteinsuspensionen (s. **Kap. 3.3.2**) erfolgte wie vom Hersteller der Centricon-Röhrchen YM-10 vorgeschrieben. Sofern die nach der Proteinpräparation erhaltenen Volumina das maximale Fassungsvermögen der Centricon-Röhrchen (2 ml) überstiegen, wurde durch wiederholte Beladung der Zentrifugationseinheiten das gesamte Volumen der jeweiligen Proteinpräparation der Aufkonzentrierung unterzogen. Im Anschluss erfolgte das Auffüllen der erhaltenen Konzentrate mit Complete Protease Inhibitor-haltigem Coatingpuffer *ad* 1 ml. Die eingengten Proteinpräparationen wurden bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ bzw. zur alsbaldigen Verwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.3.4 Proteinquantifizierung

3.3.4.1 Proteinquantifizierung mittels BCA* Protein Assay

Die kalorimetrische Bestimmung der Proteinkonzentration der nach Induktion gewonnen Lysate (s. **Kap. 3.2.1.3**) erfolgte mit dem BCA* Protein Assay Reagent nach der "Bicinchoninic-Acid-(BCA)"-Methode. Der Test wurde gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Die optische Dichte des Reaktionsansatzes bei 562 nm wurde mit dem Photometer DU 640 ermittelt.

3.3.4.2 Proteinquantifizierung mittels GeneQuant[®]

Mit Hilfe des GeneQuant[®] erfolgte bei einer Wellenlänge von 280 nm die photometrische Bestimmung des Gesamtproteingehaltes der einzelnen nach affinitätschromatographischer Aufreinigung gewonnenen Eluatfraktionen (s. **Kap. 3.3.1**). Es wurden lediglich die proteinhaltigen Eluatfraktionen der Dialyse und Proteineinengung mittels Centricon-Röhrchen YM-10 zugeführt (s. **Kap. 3.3.2** und **3.3.3**).

3.3.5 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Mittels SDS-PAGE nach Lämmli (1970) erfolgte die Auftrennung der einzelnen Peptide der Proteinpräparationen entsprechend ihrer Größe. Zur Vorbereitung wurden die proteinhaltigen Proben mit 4 µl 2 x Probenpuffer versetzt und anschließend hitzedenaturiert (100 °C, 5 min). Die Elektrophorese erfolgte in 1 x SDS-Laufpuffer bei 18 mA in der Sammelgelphase bzw. 36 mA in der Trenngelphase für ca. 2 Stunden.

Das Gel wurde nach der Elektrophorese für ca. zwei Stunden in Coomassie Brilliant Blau-Färbelösung gefärbt. Das Entfärben erfolgte mittels Blitzentfärber bzw. Entfärber unter optischer Kontrolle.

3.3.6 Western-Blot

Um die Induktion der His-tag tragenden, rekombinanten Proteine nachzuweisen, wurden alternativ die in der SDS-PAGE aufgetrennten, aber noch ungefärbten Proteine im Western-Blot unter Einsatz des Semidry-Verfahrens auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert (Burnette, 1981). In der Folge war es möglich, die His-tag tragenden Fusionsproteine durch Bindung des Ni²⁺-NTA-HRP-Konjugates (Verdünnung 1:1000; s. **Anhang**) zu detektieren und somit von anderen in der SDS-PAGE erkennbaren Proteinbanden zu unterscheiden.

Die Visualisierung der spezifischen Proteinbanden erfolgte durch eine enzymatische Reaktion des Meerrettichperoxidase-Bestandteiles des Konjugates mit der zugefügten Substratlösung (s. **Anhang**). Das Abstoppen der enzymatischen Reaktion erfolgte durch das Ergänzen von *Aqua deion.*.

3.4 Serologische Methoden

3.4.1 Nachweis muriner Antikörper mittels Immunoblot

Die mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennten und auf Nitrocellulose-Membran transferierten, rekombinanten Proteine (s. **Kap. 3.3.6**) dienten des weiteren zum Nachweis muriner Antikörper in den durch Immunisierung gewonnen Mäuseseren. Als Negativkontrollen fungierten entsprechende Präparationen der *E. coli*-Stämme BL21(DE3; pET15b) bzw. BL21[DE3; pET24b(+)] und bovines Serumalbumin (100 ng/Spur), die ebenfalls mittels Western-Blotting nach SDS-PAGE auf der Nitrocellulose-Membran immobilisiert wurden. Um vergleichbare Versuchsbedingungen für die Präparationen der rekombinanten Proteine und die entsprechenden *E. coli*-Kontrollpräparationen zu gewährleisten, erfolgte zuvor ein Abgleich der pro Spur im Rahmen der SDS-PAGE aufgetragenen Proteinmengen anhand eines in allen Proteinpräparationen enthaltenen 36 kDa-großen Proteins von *E. coli* (Daten nicht gezeigt).

Zum Nachweis der durch die Immunisierung mit rekombinanten Proteinen induzierten humoralen Immunantwort wurden die murinen Seren 1:500 verdünnt (**vergl. Kap. 4.3.2**) und mit den immobilisierten *C. burnetii*-Proteinen sowie den Negativkontrollen inkubiert. Zur Visualisierung der Bindung der primären Antikörper diente ein Peroxidase-konjugiertes Ziege-Anti-Maus-Immunglobulin der Klasse G (Verdünnung 1:1000). Diese Untersuchung wurde mit allen Mäuseseren, die im Rahmen der Überprüfung der Immunogenität der rekombinanten *C. burnetii*-Proteine gewonnen wurden, (s. **Kap. 3.6.3; Tabelle 8 und Tabelle 9**) durchgeführt. Für Seren, bei denen in der Verdünnung 1:500 (s. o.) keine Antikörper gegen die rekombinanten *C. burnetii*-Proteine nachweisbar waren und ausreichende Serummengen zur Verfügung standen (**s. Kap. 3.6.3.3**), erfolgte ergänzend eine Testdurchführung mit einer Serumverdünnung von 1:100 (**vergl. Kap. 4.3.2.3**).

Um Kreuzreaktionen vorhandener Antikörper mit den entsprechenden homologen Proteinen von *C. burnetii* nachzuweisen, erfolgte die Durchführung von Immunoblots mit *C. burnetii*-Ganzzelllysaten. Zu diesem Zweck wurden $2,5 \times 10^7$ Partikel je Spur eines *C. burnetii*-Ganzzelllysates (Isolat Nine Mile RSA493, Phase II) elektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrocellulose-Membran transferiert und mit den durch Immunisierung gewonnenen murinen Seren (**vergl. Kap. 4.3.2.3**) entwickelt.

3.5 Nukleinsäureanalytik

3.5.1 Isolierung von genomischer DNA aus murinen Gewebeproben

Für die Isolierung von Gesamt-DNA aus den murinen Gewebeproben (s. **Kap. 3.2.3.2**) wurde ein Silica-Gel-Membran-basiertes System genutzt. Nach der Zelllyse bindet die DNA selektiv an die Membran und kann nach mehreren Waschschritten ohne störende Kontaminationen eluiert werden. Die Isolierung der genomischen DNA wurde entsprechend den Vorgaben des Herstellers mittels DNeasy[®] Tissue Kit durchgeführt. Die Lagerung der isolierten DNA erfolgte bei 4 °C.

3.5.2 Isolierung bakterieller Plasmide

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Isolierung der Plasmid-DNA aus Bakterienzellen mittels GFX[™] Micro Plasmid Prep Kit. Mit diesem Verfahren können 3 - 6 µg hochreine Plasmid-DNA pro ml lysierter Bakterienkultur gewonnen werden. Die Isolierung wurde entsprechend den Vorschriften des Herstellers durchgeführt. Die Lagerung der in 100 µl *Aqua bidest.* vorliegenden Plasmid-DNA erfolgte bei 4 °C.

3.5.3 Sequenzierung der für die Expression der rekombinanten *C. burnetii*-Proteine klonierten DNA-Sequenzen

Die Überprüfung der in die Expressionsvektoren klonierten DNA-Fragmente (s. **Kap. 3.1.3**) erfolgte durch Sequenzierung und anschließenden Abgleich mit bekannten Gensequenzen. Die Sequenzierungsreaktionen wurden durch den Sequenzierungsservice des Institutes für Medizinische Mikrobiologie, Universitätsklinikum Gießen, durchgeführt. Die vollständige Abdeckung der klonierten Bereiche erfolgte bei größeren Fragmenten mittels *primer walking*. Die verwendeten Primer sind in **Tabelle 7** aufgeführt.

3.5.4 Oligodesoxyribonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligodesoxyribonukleotide wurden mit Ausnahme von pET-A und pET-B, die bereits im IHIT vorlagen, von der Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim bezogen. Vor der Nutzung wurden die Primer in *Aqua deion.* gelöst und auf eine Konzentration von 10 pmol/µl eingestellt. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C. Für weitere Details s. **Tabelle 7**.

Tabelle 7: Im Rahmen der Arbeit genutzte Oligodesoxyribonukleotide.

Primer	Sequenz	Lokalisation		
		Gen/Plasmid	Position [bp]	Quelle/Acc. No.
pET-A	GTTATGCTAGTTATTGCTCAGCGG	pET15b/pET24b(+)	88-64	pET-15b/pET-24b(+)
pET-B	CCCGCGAAATTAATACGACTCAC	pET15b/pET24b(+)	314-337	pET-15b/pET-24b(+)
se-pmm-1	GCCATCATCAAAACCAAAACCATTTCATCTT	<i>algC</i>	3.133-3.166	X79075
se-pmm-2	TGCATCGCCATCAAAAGCCAACC	<i>algC</i>	3.424-3.446	X79075
se-pmm-3	TGGAAAAACATTGAGGTCGGAAAGAGA	<i>algC</i>	3.793-3.766	X79075
se-htpB-1	ATGCGGGTGATGTACCAACAACAG	<i>htpB</i>	760-783	M20482
se-htpB-2	AAACATGAGTGCGGAGCTTGAAAATC	<i>htpB</i>	1.135-1.161	M20482
se-htpB-3	AGCGACAACGGCTGCTGAACAC	<i>htpB</i>	1.907-1.885	M20482
se-htpB-4	GCATCTTCCACGCGGGCTTTTT	<i>htpB</i>	1.705-1.684	M20482
se-crc-1	ATTGTTATTACCACGATGCGGAAAAGAGC	<i>xth</i>	264.127-264.155	AE016960
se-crc-2	TCCAATCGCCGCAAAATAATGAAAG	<i>xth</i>	264.414-264.390	AE016960
se-crc-3	TTCGCGACAATAAATACCAACACCACT	<i>xth</i>	264.188-264.161	AE016960
se-crc-4	GATTGGTTAAACGACACAGAAAGCGGACATT	<i>xth</i>	264.026-264.055	AE016960

Fortsetzung der **Tabelle 7** auf der nächsten Seite

Fortsetzung der Tabelle 7

Primer	Sequenz	Lokalisation		
		Gen/Plasmid	Position [bp]	Quelle/Acc. No.
se-orf410-1	CCAAAAATAGACGTCGAAAAGGAAT	<i>orf410</i>	24.082-24.106	X75356
se-orf410-3	TTTTTGTCTGTATAAGGGCGACTGGA	<i>orf410</i>	24.312-24.288	X75356
se-orf410-4	TGCTGCAAGAAAGAAATATGTCGATGTAAAT	<i>orf410</i>	24.240-24.268	X75356
se-mip-2	GGCGTTTGATAAATGGGACCGTGTT	<i>mip</i>	516-540	U14170
se-mip-3	AGCATGGCTCTGTGGCAATGG	<i>mip</i>	320-299	U14170
se-mucZ-1	TTGCCCTCAGTAAATAAACGAATGG	<i>mucZ</i>	477-453	L42518

3.6 Tierexperimentelle Arbeiten

3.6.1 Tierhaltung und -verwendung

Für die Immunisierungs- bzw. Infektionsversuche wurden weibliche, ca. 8 Wochen alte BALB/c-Mäuse (Fa. Harlan-Winkelmann, Borcheln; Fa. Charles River Deutschland, Sulzfeld) verwendet. Die Tiere wurden auf Sägespäneinstreu in Typ III Standardkäfigen aus Makrolon gehalten, *ad libitum* mit einem pelletierten, kommerziellen Alleinfuttermittel gefüttert und über Flaschentränken mit Wasser versorgt. Infizierte Tiere erhielten zusätzlich portionsweise halbfesten, sterilen Nahrungsbrei (Kartoffeln, Karotte, Rindfleisch; Fa. Bebivita, München).

Um die Gewichtsentwicklung der Mäuse zu dokumentieren, wurden diese bei Ankunft und anschließend alle sieben Tage gewogen. Die Wiegeintervalle verkürzten sich nach der Infektion der Mäuse mit *C. burnetii* (s. **Kap. 3.6.5.2**) auf drei Tage.

3.6.2 Injektion der Mäuse

3.6.2.1 Subkutane Injektionen

Subkutane Injektionen zur Immunisierung der Mäuse (s. **Kap. 3.6.3.1** und **3.6.5.1**) erfolgten *lege artis* an der seitlichen Brustwand oder in einer Hautfalte im Nackenbereich mit einer Kanüle der Größe 10 x 0,5 mm. Das Injektionsvolumen betrug einheitlich 370 µl.

3.6.2.2 Intraperitoneale Injektionen

Die Kanüle (0,45 x 23 mm) wurde seitlich der Medianen zwischen den beiden letzten Gesäugekomplexen der fixierten Mäuse etwa 0,5-1 cm tief eingestochen und der Spritzeninhalt in die Bauchhöhle appliziert.

3.6.3 Überprüfung der Verträglichkeit und Immunogenität der acht rekombinanten *C. burnetii*-Proteine im Tiermodell

3.6.3.1 Immunisierung

Die Mäuse wurden nach dem Zufallsprinzip in zwei Gruppen (Adjuvansgruppen, s. **Tabelle 8** und **Tabelle 9**) mit je 14 Untergruppen à sechs Tiere eingeteilt. Nach der Eingewöhnungsphase von 7 Tagen erfolgte die Immunisierung von fünf Tieren jeder Gruppe durch zweimalige, im Abstand von vierzehn Tagen durchgeführte, subkutane Injektionen. Die Impflinge erhielten entweder Präparationen

einzelner rekombinanter Proteine (20 µg Protein/Tier) oder Kombinationen aus diesen, wobei entweder vier (80 µg Gesamtprotein/Tier) oder acht Proteinpräparationen (160 µg Gesamtprotein/Tier) gemeinsam appliziert wurden (s. **Tabelle 8** und **Tabelle 9**). Die für die Injektion bestimmten Aliquots der Einzelproteinpräparationen bzw. -kombinationen wurden jeweils entweder mit BAY R1005 oder mit Al(OH)₃ (Alu-Gel-S, s. **Anhang**) als Adjuvans versetzt. Als Kontrollen dienten Tiergruppen, die entsprechend adjuvantierte Proteinpräparationen (40 µg Protein/Tier) des *E. coli*-Stammes BL21(DE3; pET15b) bzw. BL21[DE3; pET24b(+)] (*E. coli*-Kontrollen), BAY R1005 bzw. Al(OH)₃ ohne Proteinzusatz (Adjuvanskontrollen) oder 1 x PBS (Negativkontrolle) appliziert bekamen. Ein Tier pro Gruppe wurde individuell gekennzeichnet und nicht immunisiert (Nicht-Immunisierungskontrolle). Die Gruppeneinteilung und die applizierten Substanzen sind in **Tabelle 8** und **Tabelle 9** detailliert aufgeführt.

3.6.3.2 Narkose und Tötung der Mäuse

Die Mäuse wurden durch die *i. p.* Verabreichung von 0,1 ml/10 g Körpergewicht einer Anästhetikakombination (1 ml Rompun[®], 0,75 ml Ketavet[®], NaCl *ad* 10 ml) narkotisiert. Die Tötung der Tiere erfolgte in tiefer Betäubung (Ausfall des Cornealreflexes) durch Dekapitation.

3.6.3.3 Serumgewinnung bei der Maus

Die Serumgewinnung erfolgte 14 bis 16 Tage nach der Boosterung der Tiere durch Dekapitation. Das Blut wurde in sterilen 1,5 ml-fassenden Reaktionsgefäßen aufgefangen und über Nacht bei 4 °C aufbewahrt. Am nächsten Tag erfolgte die Serumgewinnung durch Zentrifugation (10.000 x *g*, 10 min, RT). Die Seren wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

In Abhängigkeit vom verwendeten Adjuvans konnten von den Mäusen unterschiedliche Mengen an Serum (BAY R1005: durchschnittlich 197 µl; Al(OH)₃: durchschnittlich 185 µl) gewonnen werden. Dies bedingte, dass für die nachfolgenden Untersuchungen in der Al(OH)₃-Adjuvansgruppe weniger Probenmaterial zur Verfügung stand und somit nicht alle Tiere hinsichtlich jeden Parameters charakterisiert werden konnten.

Tabelle 8: Gruppeneinteilung und Impfstoffzusammensetzung der Al(OH)₃-Adjuvansgruppe (A) für den Immunisierungsversuch.

Gruppenbezeichnung	inj. # rekombinantes Antigen	inj. # Kontrollantigene/ Substanzen	Proteinmenge/Tier	Funktion	Anzahl der behandelten Tiere/Gruppe
rOmp + Al(OH) ₃	rOmp	-	20 µg	-	5/6*
rPmm + Al(OH) ₃	rPmm	-	20 µg	-	5/6
rHspB + Al(OH) ₃	rHspB	-	20 µg	-	5/6
rFbp + Al(OH) ₃	rFbp	-	20 µg	-	5/6
rOrf410 + Al(OH) ₃	rOrf410	-	20 µg	-	5/6
rCrc + Al(OH) ₃	rCrc	-	20 µg	-	5/6
rCbMip + Al(OH) ₃	rCbMip	-	20 µg	-	5/6
rMucZ + Al(OH) ₃	rMucZ	-	20 µg	-	5/6
rOmp - rFbp + Al(OH) ₃	rOmp, rPmm, rHspB, rFbp	-	80 µg	-	5/6
rOrf410 - rMucZ + Al(OH) ₃	rOrf410, rCrc, rCbMip, rMucZ	-	80 µg	-	5/6
160 µg rPr. + Al(OH) ₃	rOmp - rMucZ	-	160 µg	-	5/6
<i>E. coli</i> -Pr. + Al(OH) ₃	-	BL21(DE3; pET15b) + BL21[DE3; pET24b(+)]	40 µg	<i>E. coli</i> -Kontrolle	5/6
Al(OH) ₃	-	Al(OH) ₃	-	Adjuvanskontrolle	5/6
PBS	-	1 x PBS	-	Negativkontrolle	5/6

Erläuterung: # inj. = injiziertes/injizierte

* Das sechste Tier jeder Gruppe diente als Nicht-Immunisierungskontrolle (für Details siehe Text).

Tabelle 9: Gruppeneinteilung und Impfstoffzusammensetzung der **BAY R1005-Adjuvansgruppe (B)** für den Immunisierungsversuch.

Gruppenbezeichnung	inj. # rekombinantes Antigen	inj. # Kontrollantigene/ Substanzen	Proteinmenge/Tier	Funktion	Anzahl der behandelten Tiere/Gruppe
rOmp + BAY R1005	rOmp	-	20 µg	-	5/6*
rPmm + BAY R1005	rPmm	-	20 µg	-	5/6
rHspB + BAY R1005	rHspB	-	20 µg	-	5/6
rFbp + BAY R1005	rFbp	-	20 µg	-	5/6
rOrf410 + BAY R1005	rOrf410	-	20 µg	-	5/6
rCrc + BAY R1005	rCrc	-	20 µg	-	5/6
rCbMip + BAY R1005	rCbMip	-	20 µg	-	5/6
rMucZ + BAY R1005	rMucZ	-	20 µg	-	5/6
rOmp - rFbp + BAY R1005	rOmp, rPmm, rHspB, rFbp	-	80 µg	-	5/6
rOrf410 - rMucZ + BAY R1005	rOrf410, rCrc, rCbMip, rMucZ	-	80 µg	-	5/6
160 µg rPr. + BAY R1005	rOmp - rMucZ	-	160 µg	-	5/6
<i>E. coli</i> -Pr. + BAY R1005	-	BL21(DE3; pET15b) + BL21[DE3; pET24b(+)]	40 µg	<i>E. coli</i> -Kontrolle	5/6
BAY R1005	-	BAY R1005	-	Adjuvanskontrolle	5/6
PBS	-	1 x PBS	-	Negativkontrolle	5/6

Erläuterung: # inj. = injiziertes/injizierte

* Das sechste Tier jeder Gruppe diente als Nicht-Immunisierungskontrolle (für Details siehe Text).

3.6.4 Ermittlung der für das Mausinfektionsmodell einzusetzenden infektiösen Dosis des *C. burnetii*-Isolates

Die Mäuse wurden nach dem Zufallsprinzip in sieben Gruppen à drei Tiere eingeteilt. Nach einer Eingewöhnungszeit von 5 Tagen erfolgte die *i. p.* Infektion von sechs der sieben Gruppen mit dem *C. burnetii*-Isolat Nine Mile RSA493 (Phasengemisch) in unterschiedlichen Konzentrationen ($9,2 \times 10^8$ P., 6×10^8 P., 3×10^8 P., 1×10^8 P., $9,2 \times 10^7$ P. bzw. $9,2 \times 10^6$ P. je Tier; Volumen = 300 μ l, s. **Tabelle 10**). Alle Mäuse zeigten *p. inf.* eine für *C. burnetii*-Infektionen typische Symptomatik (gesträubtes Fell, aufgekrümmter Rücken, Bewegungsunlust und Gewichtsverlust), wobei sich die Dauer und die Intensität der Erkrankung als dosisabhängig erwies (s. **Tabelle 10**). Bei Infektion mit $9,2 \times 10^8$ Partikeln pro Tier konnte die Erkrankung bereits einen Tag *p. inf.* festgestellt werden. Die Tiere zeigten ein hochgradig gestörtes Allgemeinbefinden sowie Gewichtsverluste von bis zu 16 %. Erfolgte die Infektion lediglich mit $9,2 \times 10^6$ Partikeln pro Tier wiesen die Tiere erst drei Tage *p. inf.* ein leicht bis mittelgradig gestörtes Allgemeinbefinden und Gewichtsverluste von max. 12 % auf. Im Rahmen der Sektion (7 Tage *p. inf.*) war zudem bei allen infizierten Tieren eine Spleno- und Hepatomegalie festzustellen (s. **Tabelle 10**). Des weiteren entwickelten die mit $9,2 \times 10^8$ Partikel pro Tier *i. p.* infizierten Mäusen eine Peritonitis mit Aszitesbildung (s. **Tabelle 10**).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die infektiöse Dosis für die Wirksamkeitsprüfung mit den rekombinanten *C. burnetii*-Proteinen als *subunit*-Vakzine auf $1,8 \times 10^8$ Partikel pro Tier festgelegt.

Tabelle 10: Entwicklung dosisabhängiger Symptome nach Infektion der Mäuse mit verschiedenen Mengen des *C. burnetii*-Isolates Nine Mile RSA493.

infektiöse Dosis*	Symptome				
	gesträubtes Haarkleid	aufgekrümmter Rücken	Lethargie	Spleno- und Hepatomegalie	Aszites
$9,2 \times 10^8$	+++	+++	+++	+++	+++
6×10^8	+++	+++	+++	+++	-
3×10^8	+++	+++	++	+++	-
1×10^8	+++	+++	++	+++	-
$9,2 \times 10^7$	++	+++	++	+++	-
$9,2 \times 10^6$	++	++	+	++	-

Erläuterung: * Partikel (P.) des *C. burnetii*-Isolates Nine Mile RSA493; die Infektion erfolgte *i. p.*

- = nicht vorhanden ++ = mittelgradig

+ = geringgradig +++ = hochgradig

3.6.5 Wirksamkeitsprüfung mit den acht rekombinanten *C. burnetii*-Proteinen als subunit-Vakzine im Mausinfektionsmodell

Die Wirksamkeitsprüfung erfolgte in zwei voneinander unabhängigen Versuchsdurchführungen. Es handelte sich bei diesen Untersuchungen um ein genehmigungspflichtiges Tierversuchsvorhaben.

3.6.5.1 Immunisierung

Die Mäuse wurden jeweils nach dem Zufallsprinzip in sechs Gruppen à sechs Tiere eingeteilt. Nach einer siebentägigen Eingewöhnungsphase erfolgte die Immunisierung von 30 Tieren (5 Gruppen à 6 Tiere, s. **Tabelle 11**) durch zwei, im Abstand von vierzehn Tagen durchgeführte, subkutane Injektionen. Die Impflinge erhielten eine Kombinationspräparat bestehend aus den acht rekombinanten Proteinen rOmp, rPmm, rHspB, rOrf410, rCrc, rCbMip und rMucZ versetzt mit dem Adjuvans BAY R1005 (s. **Tabelle 11** und **Abbildung 2**). Als Kontrollen dienten Tiergruppen, die Proteinpräparationen des *E. coli*-Stammes BL21(DE3 pET15b) bzw. BL21[DE3 pET24b(+)] ohne rekombinante Proteine in einer Gesamtproteinmenge von 40 µg/Tier (*E. coli*-Kontrolle), BAY R1005 ohne Proteinzusatz (Adjuvanskontrolle), Q-VaxTM (Vakzinierungskontrolle) oder 1 x PBS (Negativkontrolle) appliziert bekamen. Darüber hinaus diente eine Gruppe, die weder immunisiert noch infiziert (ohne Immunisierung/Infektion) wurde, während des gesamten Versuchszeitraumes als Referenzgruppe.

Die Tiere erhielten die entsprechenden Proteinpräparationen bzw. die Kontrollsubstanzen in einem einheitlichen Injektionsvolumen von 370 µl pro Tier. Lediglich die Mäuse der Vakzinierungskontrolle wurden nur einmalig mit 1 µg des Impfstoffes Q-VaxTM, der in 0,5 ml physiologischer Kochsalzlösung suspendiert vorlag, *i. p.* immunisiert (Waag, 1997; s. **Kap. 3.1.5.1**). Für die zweite Versuchsdurchführung wurden die Versuchsgruppen nach der Immunisierung anonymisiert, um eine unvoreingenommene Erhebung der klinischen Befunde zu gewährleisten.

Die Infektion mit *C. burnetii* (s. **Kap. 3.6.5.2** und **Abbildung 2**) erfolgte fünf Wochen nach der Boosterung der Tiere.

Tabelle 11: Gruppeneinteilung und Zusammensetzung der applizierten Substanzen für die Überprüfung der Wirksamkeit der acht rekombinanten *C. burnetii*-Proteine als *subunit*-Vakzine (gültig für beide Versuchsdurchführung).

Gruppenbezeichnung	Funktion	inj. # rekombinante	inj. # Kontrollanti- gene/Substanzen	Proteinmenge/ Tier	Adjuvans	Infektion*
160 µg rPr. + BAY R1005	-	rOmp - rMucZ	-	160 µg	BAY R1005	ja
Q-Vax TM	Vakzinierungskontrolle	-	Q-Vax TM	-	-	ja
<i>E. coli</i> -Pr. + BAY R1005	<i>E. coli</i> -Kontrolle	-	BL21(DE3; pET15b) + BL21]DE3; pET24b(+)]	40 µg	BAY R1005	ja
BAY R1005	Adjuvanskontrolle	-	BAY R1005	-	BAY R1005	ja
PBS	Negativkontrolle	-	1 x PBS	-	-	ja
nicht immunisiert/infiziert	Referenz	-	-	-	-	nein

Erläuterung: # inj. = injizierte; rPr. = rekombinante *C. burnetii*-Proteine; Pr. = Protein

* Die Infektion erfolgte mit $1,8 \times 10^8$ Partikeln des *C. burnetii*-Isolates Nine Mile RSA493 (Phasengemisch).

3.6.5.2 Infektion

Vor der Infektion erfolgte eine Kennzeichnung der Tiere, die eine individuelle Zuordnung der erhobenen Befunde ermöglichte. Es wurden 30 der 36 Mäuse (5 Gruppen à 6 Tiere, s. **Tabelle 11**) mit $1,8 \times 10^8$ Partikeln des *C. burnetii*-Isolates Nine Mile RSA493 (Phasengemisch) *i. p.* infiziert (s. **Abbildung 2**). Die mit *C. burnetii*-infizierten Tiere wurden während des Versuchszeitraumes in einem aerosoldichten Isolator gehalten und täglich adspektorisch kontrolliert. Als Parameter für die Beurteilung des Gesundheitszustandes der Mäuse dienten das Aussehen des Haarkleides, die Haltung des Rückens, die Aktivität (bestimmt als Zeit bis zum Verlassen des Nestes nach Störung, Bewegungsdrang bzw. -unlust, Veränderungen im Bewegungsablauf) und ggf. sonstige Auffälligkeiten. Die Schwere der Erkrankung bzw. die zur Beurteilung des Gesundheitszustandes herangezogenen Parameter (s. **Tabelle 12**) wurden unabhängig voneinander durch zwei Untersucher bewertet. Die für die einzelnen Tiere erhobenen Befunde wurden nach Beendigung des Versuches gruppenweise zusammengefasst und einer von fünf Beurteilungskategorien zugeordnet (s. **Tabelle 12**). Dabei entsprach die Wertung "0" einem ungestörten Allgemeinbefinden, "2" einem geringgradig, "4" einem mittelgradig und "6" einem hochgradig gestörten Allgemeinbefinden der Tiere. Die Beurteilung "8" war für Gruppen vorgesehen, bei denen Todesfälle auftraten; sie wurde nicht vergeben.

Tabelle 12: Bewertungsschlüssel für die Beurteilung des Krankheitsverlaufes bei *C. burnetii*-infizierten Mäusen.

Bewertung	klinische Beurteilung	Symptomatik*
0	ungestörtes Allgemeinbefinden	klinisch unauffällig
2	leicht gestörtes Allgemeinbefinden	Abstehen des Haarkleides ≤ (+) Aufwölbung des Rückens - Aktivitätsreduzierung -
4	mittelgradig gestörtes Allgemeinbefinden	Abstehen des Haarkleides + bis ++ Aufwölbung des Rückens (+) bis ++ Aktivitätsreduzierung (+) bis ++
6	hochgradig gestörtes Allgemeinbefinden	Abstehen des Haarkleides ≥ ++ Aufwölbung des Rückens ≥ ++ Aktivitätsreduzierung ≥ ++
8	Tod	Auftreten eines oder mehrerer Todesfälle in einer Gruppe

Erläuterung: * Auftreten bei mind. 2/3 der Tiere einer Gruppe; Ausnahme: Todesfälle

- = nicht feststellbar

+(+) = mittlere Ausprägung

(+) = minimale Ausprägung

++ = hochgradige Ausprägung

+ = geringe Ausprägung

Als weitere Parameter wurden die Inkubationszeit und die Dauer der Erkrankung erfasst. Die Schwere der Symptomatik in Relation zum zeitlichen Verlauf diente zur Berechnung des „summierten klinischen Index (sKI)“, der nach folgender Formel berechnet wurde:

$$\text{sKI} = \frac{\text{Summe der täglichen Bewertung des Krankheitsverlaufes ab Tag 1 bis Tag 14 } p. \text{ inf.}}{14 \text{ Tage}}$$

Neben der täglichen Adspektion der Tiere zur Beurteilung des Gesundheitszustandes wurden die Mäuse an jedem dritten Tag *p. inf.* gewogen, um den Verlauf der Gewichtsentwicklung zu dokumentieren.

3.6.5.3 Tötung und Sektion der Tiere

Die Tötung (s. **Kap. 3.6.3.2**) und die anschließende Sektion der Tiere einer Gruppe erfolgte zu zwei unterschiedlichen Versuchszeitpunkten: Drei von sechs Mäusen wurden sieben Tage *p. inf.* und die restlichen drei Tiere pro Gruppe an Tag 14 *p. inf.* der Versuchsauswertung zugeführt (**Abbildung 2**). Dazu wurden den Tieren jeweils die Milz, Leber und Nieren entnommen und die einzelnen Organgewichte unter sterilen Kautelen bestimmt. Bezüglich des weiteren Vorgehens s. **Kapitel 3.2.3.2**.

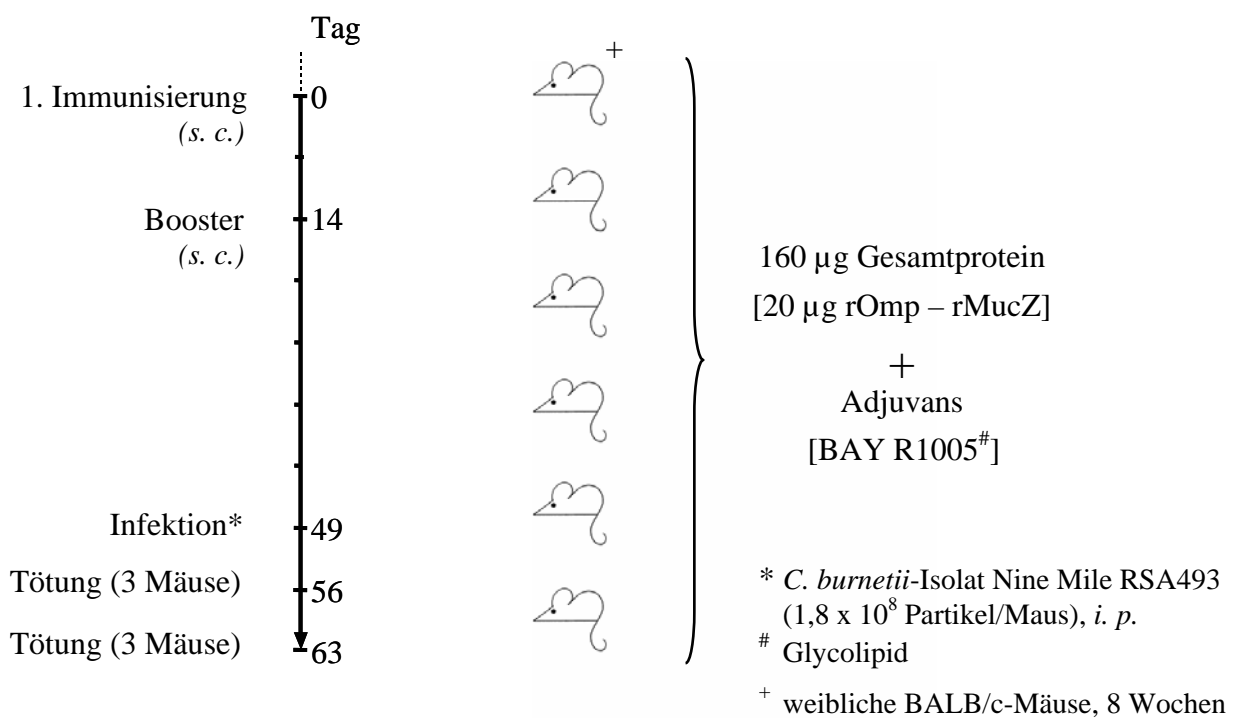


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Versuchsdurchführung zur Überprüfung der Wirksamkeit der rekombinanten *C. burnetii*-Proteine als *subunit*-Vakzine (gültig für beide Versuchsdurchführungen).

3.7 Datenhaltung und Auswertung

3.7.1 Bearbeitung und Analyse der Sequenzierungsdaten

Das *assembly* der im Rahmen dieser Arbeit generierten Sequenzierungsdaten (s. **Kap. 3.5.3**) erfolgte mit SeqMan (LASERGENE®, DNASTAR Ltd.). Die Analyse der resultierenden DNA-Sequenzen wurde mit verschiedenen Programmodulen von LASERGENE® (EditSeq, MapDraw und MegAlign) durchgeführt.

3.7.2 Statistische Auswertung

Die Datenhaltung und -auswertung erfolgte auf den Rechnern im lokalen Rechnernetzwerk (LAN) der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen. Die statistischen Auswertungen wurden unter Verwendung des Statistikprogrammpaketes BMDP/Dynamic, Release 7.0 (Dixon, 1993) durchgeführt.

Zur statistischen Prüfung des Gruppeneinflusses auf Signifikanz wurde bei den annähernd normalverteilten Merkmalen eine einfaktorielle Varianzanalyse mit dem Programm BMDP7D durchgeführt. Bei signifikantem Resultat wurden die Gruppen anschließend paarweise mit dem Student-Newman-Keuls-Verfahren oder, falls nicht zulässig, mit dem Turkey-Verfahren verglichen (Sachs, 1992).

Bei der Bewertung der statistischen Signifikanzen wurde das Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ zugrunde gelegt, d. h. Ergebnisse mit $p \leq 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen. Die Signifikanzschwellen sind in **Tabelle 13** aufgeführt.

Tabelle 13: Verwendete Signifikanzschwellen.

Signifikanz	p-Wert	Symbol
hoch signifikant	$p \leq 0,001$	***
signifikant	$0,001 < p \leq 0,01$	**
schwach signifikant	$0,01 < p \leq 0,05$	*
nicht signifikant	$p > 0,05$	n. s.

4 ERGEBNISSE

4.1 Sequenzierungsergebnisse für die acht, die rekombinanten *C. burnetii*-Proteine kodierenden Inserts

Aus Gründen der Übersicht wurde zur graphischen Darstellung der Sequenzierungsergebnisse bzw. für die Abgleiche mit den entsprechenden Datenbankeinträgen auf die translatierten Nukleotidsequenzen der rekombinanten *C. burnetii*-Proteine zurückgegriffen.

4.1.1 *com1*

Der Abgleich der für das Insert des rekombinanten Plasmids pTR-14-B erhaltenen Nukleotidsequenz mit dem entsprechenden Datenbankeintrag für *com1* (Acc. No. Z11828) ergab eine Basendeletion an Position 627. Die resultierende Verschiebung des Leserasters (s. **Abbildung 3**) bedingte einen vorzeitigen Translationsstopp an Aminosäureposition 226 des Fusionsproteins. Das Molekulargewicht des entsprechenden Genproduktes wurde auf ca. 22,5 kDa geschätzt. Dieser Wert konnte in der SDS-PAGE experimentell bestätigt werden (s. **Kap. 4.2.3**).

com1(Acc.No.Z11828)	-----VKNRLTALFLAGTLTAGVAI AAP	AS 23
com1(pTR-14-B)	HHHHHS S GL VPRGS HMVKNRLTALFLAGTLTAGVAI AAP	40
com1(Acc.No.Z11828)	S Q F S F S P Q Q V K D I Q S I V H H Y L V N H P E V L V E A S Q A L Q K K T E	63
com1(pTR-14-B)	S Q F S F S P Q Q V K D I Q S I V H H Y L V N H P E V L V E A S Q A L Q K K T E	80
com1(Acc.No.Z11828)	A Q Q E E H A Q Q A I K E N A K K L F N D P A S P V A G N P H G N V T L V E F F	103
com1(pTR-14-B)	A Q Q E E H A Q Q A I K E N A K K L F N D P A S P V A G N P H G N V T L V E F F	120
com1(Acc.No.Z11828)	D Y Q C G H C K A M N S V I Q A I V K Q N K N L R V V F K E L P I F G G Q S Q Y	143
com1(pTR-14-B)	D Y Q C G H C K A M N S V I Q A I V K Q N K N L R V V F K E L P I F G G Q S Q Y	160
com1(Acc.No.Z11828)	A A K V S L A A A K Q G K Y Y A F H D A L L S V D G Q L S E Q I T L Q T A E K V	183
com1(pTR-14-B)	A A K V S L A A A K Q G K Y Y A F H D A L L S V D G Q L S E Q I T L Q T A E K V	200
com1(Acc.No.Z11828)	G L N V A Q L K K D M D N P A I Q K Q L R D N F Q L A Q S L Q L A G T P T F V I	223
com1(pTR-14-B)	G L N V A Q L K K T W I I L L S K N N C V I T S N . L N R Y S . Q A P R R S S L	240
com1(Acc.No.Z11828)	G N K A L T K F G F I P G A T S Q Q N L Q K E I D R V E K	253
com1(pTR-14-B)	V I K R . P N S V L Y P A P P H N K T F K K S T G . K M .	270

↑ = vorzeitiger Translationsstopp

Abbildung 3: Alignment von Omp.

Aminosäuren, die denen des Datenbankeintrages entsprechen, sind umrandet. Die Position des vorzeitigen Translationsstops ist markiert (↑). Die unterstrichenen Aminosäuren am N-Terminus stellen die Linkersequenz des pET15b-Vektors bzw. das His-tag dar.

com1 (Acc. No. Z11828) = translatierter Datenbankeintrag

com1 (p-TR-14-B) = translatiertes Sequenzierungsergebnis für rOmp

4.1.2 *algC*

Das Insert *algC* auf dem rekombinanten Plasmid p-TR-17-G hat eine Länge von 1.371 Basenpaaren. Die für dieses Insert ermittelten Sequenzierungsfiles wurden mit der in der Datenbank unter der *Acc. No.* X79075 geführten Nukleotidsequenz (*orf456*, Synonym für *algC*) verglichen. Dabei konnte bei bp 372 ein Basenaustausch ermittelt werden, der eine stille Mutation bedingte (s. **Abbildung 4**). Im Gegensatz dazu führten weitere Basenaustausche zu Mutationen der Aminosäuresequenz an Position 17 und 333 des Fusionsproteins (V17M, G333E).

<i>algC</i> (<i>Acc.No.</i> X79075)	-----V P A T L F R A Y D I R G P V T S E A L T P G L	AS 24
<i>algC</i> (pTR-17-G)	HHHHHHS S G L V P R G S H M P A T L F R A Y D I R G P V T S E A L T P G L	40
	★	
<i>algC</i> (<i>Acc.No.</i> X79075)	A Y A V G L S I G S E A R E Q G Q K A I V V G R D G R L S G P K L T A A L I Q G	64
<i>algC</i> (pTR-17-G)	A Y A V G L S I G S E A R E Q G Q K A I V V G R D G R L S G P K L T A A L I Q G	80
<i>algC</i> (<i>Acc.No.</i> X79075)	L C E T G L A V L N V G L V P T P L V Y F A T N R L E T N S G V M V T A S H N P	104
<i>algC</i> (pTR-17-G)	L C E T G L A V L N V G L V P T P L V Y F A T N R L E T N S G V M V T A S H N P	120
<i>algC</i> (<i>Acc.No.</i> X79075)	G H H N G F K I V L N G K T L R S E E I A T I R T R I L E R R F V K G H G A V V	144
<i>algC</i> (pTR-17-G)	G H H N G F K I V L N G K T L R S E E I A T I R T R I L E R R F V K G H G A V V	160
<i>algC</i> (<i>Acc.No.</i> X79075)	D V D I I E D Y E S Y I T K H I Q L D R P L K V V V D C G N G I A G K V A P A L	184
<i>algC</i> (pTR-17-G)	D V D I I E D Y E S Y I T K H I Q L D R P L K V V V D C G N G I A G K V A P A L	200
<i>algC</i> (<i>Acc.No.</i> X79075)	Y R K L G C E V V E L F C E V D G H F P N H H P D P T I P A N L T D L I H K V K	224
<i>algC</i> (pTR-17-G)	Y R K L G C E V V E L F C E V D G H F P N H H P D P T I P A N L T D L I H K V K	240
<i>algC</i> (<i>Acc.No.</i> X79075)	E T Q A D L G L A F D G D A D R L G I V T D K G E I I W P D R Q M M L F S M D V	254
<i>algC</i> (pTR-17-G)	E T Q A D L G L A F D G D A D R L G I V T D K G E I I W P D R Q M M L F S M D V	280
<i>algC</i> (<i>Acc.No.</i> X79075)	L S R L P G S D I V F D V K C S R S L A E I I K K Y G G N P V M W R T G H S I L	294
<i>algC</i> (pTR-17-G)	L S R L P G S D I V F D V K C S R S L A E I I K K Y G G N P V M W R T G H S I L	320
<i>algC</i> (<i>Acc.No.</i> X79075)	K A K L F E I G A P L A G E M S G H I F F K D E W F G F D D G I Y V G A R L L R	334
<i>algC</i> (pTR-17-G)	K A K L F E I G A P L A E E M S G H I F F K D E W F G F D D G I Y V G A R L L R	360
	★	
<i>algC</i> (<i>Acc.No.</i> X79075)	I I S Q T N Q R T S E I F A E L P D S V N T P E L K L P M T E E K K Q P F M Q A	374
<i>algC</i> (pTR-17-G)	I I S Q T N Q R T S E I F A E L P D S V N T P E L K L P M T E E K K Q P F M Q A	400
<i>algC</i> (<i>Acc.No.</i> X79075)	L L K K A D F G N A K L I T I D G L R V E F E D G W G L I R P S N T S P Y L I L	414
<i>algC</i> (pTR-17-G)	L L K K A D F G N A K L I T I D G L R V E F E D G W G L I R P S N T S P Y L I L	440
<i>algC</i> (<i>Acc.No.</i> X79075)	R F E A D T E E K L K R I Q E I F R T Q L R M I D N A L E L P F	447
<i>algC</i> (pTR-17-G)	R F E A D T E E K L K R I Q E I F R T Q L R M I D N A L E L P F	473

★ = Aminosäureausstausch

Abbildung 4: *Alignment* von Pmm.

Aminosäuren, die mit denen des Datenbankeintrages übereinstimmen, sind umrandet. Die unterstrichenen Aminosäuren am N-Terminus stellen die Linkersequenz des pET15b-Vektors bzw. das His-tag dar.

algC (*Acc. No.*X79075) = translatierter Datenbankeintrag

algC (p-TR-14-G) = translatiertes Sequenzierungsergebnis für rPmm

4.1.3 *htpB*

Das rekombinante Plasmid pTR-25 trägt das 1.659 Basenpaar große Insert *htpB*. Der Abgleich der nach Sequenzierung vorliegenden Daten mit dem Datenbankeintrag für *groEL* (Acc. No. M20482) ergab eine vollständige Übereinstimmung beider Sequenzen.

4.1.4 *fbp*

Die für das 621 Basenpaar große Insert *fbp* des rekombinanten Plasmids pHIT-V C8 ermittelten Sequenzierungsergebnisse wurden mit dem Datenbankeintrag für *fbp* (Acc. No. X75356) verglichen. Es konnten keine Mutationen festgestellt werden.

4.1.5 *orf410*

Orf410 des rekombinanten Plasmids pHIT-V C1 weist eine Länge von 1.233 Basenpaaren auf. Beim Abgleich der Sequenzierungsfiles mit dem für *orf410* vorhandenen Datenbankeintrag (Acc. No. X75356) wurden zwei Mutation ermittelt, die Aminosäureaustausche implizierten (D410E; STOP411N; s. **Abbildung 5**).

orf410(Acc.No.X75356)	ME PL MKT V PL AL FDS I EN I TAGNDYS YL KGI YDLDDI KI A	AS 40
orf410(pHIT-V C1)	ME PL MKT V PL AL FDS I EN I TAGNDYS YL KGI YDLDDI KI A	40
orf410(Acc.No.X75356)	TKFLKS YKGS QGTFNS YRREI ERLI HWCALI TNKSLKALK	80
orf410(pHIT-V C1)	TKFLKS YKGS QGTFNS YRREI ERLI HWCALI TNKSLKALK	80
orf410(Acc.No.X75356)	RDDI ENFI YFCKKPPKTWI GETKPPRFII KDGVRI PNPKW	120
orf410(pHIT-V C1)	RDDI ENFI YFCKKPPKTWI GETKPPRFII KDGVRI PNPKW	120
orf410(Acc.No.X75356)	RPFI VKLS KI ERRKGMDLDKNNFELSHGSLRESFAI LSSF	160
orf410(pHIT-V C1)	RPFI VKLS KI ERRKGMDLDKNNFELSHGSLRESFAI LSSF	160
orf410(Acc.No.X75356)	FNYLLQEEYVDVNPVALI RQKSQFI RKTQGQPKI RRLSEL	200
orf410(pHIT-V C1)	FNYLLQEEYVDVNPVALI RQKSQFI RKTQGQPKI RRLSEL	200
orf410(Acc.No.X75356)	QWQYVI KS AKSLAEQDPDI YERTLFI MSALYS MYLRI SEL	240
orf410(pHIT-V C1)	QWQYVI KS AKSLAEQDPDI YERTLFI MSALYS MYLRI SEL	240
orf410(Acc.No.X75356)	AATERWEPRMNHFHRDGDGS WWFI TVGKGNKERQI AVSNA	280
orf410(pHIT-V C1)	AATERWEPRMNHFHRDGDGS WWFI TVGKGNKERQI AVSNA	280
orf410(Acc.No.X75356)	MLKALKRWRKHLGLTSLPSPADQSPLLPKNKGRGPI KSTN	320
orf410(pHIT-V C1)	MLKALKRWRKHLGLTSLPSPADQSPLLPKNKGRGPI KSTN	320
orf410(Acc.No.X75356)	YI RNI VQYCFDRAI DQLDQDGFSEEAALNEATVHWRHT	360
orf410(pHIT-V C1)	YI RNI VQYCFDRAI DQLDQDGFSEEAALNEATVHWRHT	360
orf410(Acc.No.X75356)	GISDDVKI RPREHVRDDAGHSSSAI TDRYI DI ELRERHQS	400
orf410(pHIT-V C1)	GISDDVKI RPREHVRDDAGHSSSAI TDRYI DI ELRERHQS	400
orf410(Acc.No.X75356)	ARKKTI SDE	411
orf410(pHIT-V C1)	ARKKTI SDE	429

★ = Aminosäureaustausch

Abbildung 5: *Alignment* von Orf410.

Aminosäuren, die denen des Datenbankeintrages entsprechen, sind umrandet. Die unterstrichenen Aminosäuren am C-Terminus stellen die Linkersequenz des pET24b(+)-Vektors bzw. das His-tag dar.

orf410 (Acc. No. X75356) = translatierter Datenbankeintrag

orf410 (pHIT-V C1) = translatiertes Sequenzierungsergebnis für rOrf410

4.1.6 *crc*

Das Insert *crc* in dem rekombinanten Plasmid pHIT-V C4 hat eine Länge von 780 Basenpaaren. Der für einen Vergleich mit den Sequenzierungsfiles dienende Datenbankeintrag trug die *Acc. No.* AE016960 (Basenpaar 263.915 - 264.694). Zwei Basenpaaraustausche, die jeweils eine Mutation in der Aminosäuresequenz bedingten (D259E, STOP260N; s. **Abbildung 6**), wurden festgestellt.

xth(Acc.No.AE016960)	MRI I TLNLNGI RAAARRGFFDWLKRQKADI VCLQETKACL	AS 40
xth(pHIT-V C4)	MRI I TLNLNGI RAAARRGFFDWLKRQKADI VCLQETKACL	40
xth(Acc.No.AE016960)	E I TNGDQFHPKGYHCYYHDAEKS GYS GVGI YCREKPDRVT	80
xth(pHIT-V C4)	E I TNGDQFHPKGYHCYYHDAEKS GYS GVGI YCREKPDRVT	80
xth(Acc.No.AE016960)	TRLGWEHADKEGRYI QADFGSLSVASLYMPSGTTGEHRQK	120
xth(pHIT-V C4)	TRLGWEHADKEGRYI QADFGSLSVASLYMPSGTTGEHRQK	120
xth(Acc.No.AE016960)	I KFD FMDRYMKRLKNI VHS KRSFI I CGDWNI VHKEI DI KN	160
xth(pHIT-V C4)	I KFD FMDRYMKRLKNI VHS KRSFI I CGDWNI VHKEI DI KN	160
xth(Acc.No.AE016960)	F KSNQKYS GCLPEERAWLDEVFTKVGLVDAFRVVNQKPDQ	200
xth(pHIT-V C4)	F KSNQKYS GCLPEERAWLDEVFTKVGLVDAFRVVNQKPDQ	200
xth(Acc.No.AE016960)	YT WWS SRGRAWEKNVGWRI DYQVI TSDLKNS VKSERI YKD	240
xth(pHIT-V C4)	YT WWS SRGRAWEKNVGWRI DYQVI TSDLKNS VKSERI YKD	240
xth(Acc.No.AE016960)	KRFSDHAPLI I DYEREI S <u>D</u> .	260
xth(pHIT-V C4)	KRFSDHAPLI I DYEREI S <u>E</u> NS S S VDKLAAALEHHHHHH	278

★ ★

★ = Aminosäureausstausch

Abbildung 6: *Alignment* von Crc.

Aminosäuren, die denen des Datenbankeintrages glichen, sind umrandet. Die unterstrichenen Aminosäuren am C-Terminus stellen die Linkersequenz des pET24b(+)-Vektors bzw. das His-tag dar.

crc (Acc. No. AE016960) = translatierter Datenbankeintrag

crc (pHIT-V C4) = translatiertes Sequenzierungsergebnis für rCrc

4.1.7 *mip*

Die für das 693 Basenpaar große Insert *mip* des rekombinanten Plasmids pHIT-V C5 ermittelten Sequenzierungsdaten wurden mit dem Datenbankeintrag für *mip* (*Acc. No.* U14170) verglichen. Es konnten insgesamt drei Punktmutationen nachgewiesen werden, die zwei Aminosäureaustausche bedingten (H93Y; STOP231N; s. **Abbildung 7**). Zusätzlich wurde in der translatierten Sequenz an Position 167 ein Aminosäureaustausch (N167Q) festgestellt, der durch eine Insertion eines Tyrosinrestes bedingt war. Die Korrektur des daraus resultierenden *frameshifts* erfolgte bereits 3 bp später durch die Deletion eines Tyrosinrestes.

		AS
mip(Acc.No.U14170)	MKRLI LPFLS VGLLL GTTAAHAATPLKTEQDKLSYSMGVMT	40
mip(pHIT-V C5)	MKRLI LPFLS VGLLL GTTAAHAATPLKTEQDKLSYSMGVMT	40
mip(Acc.No.U14170)	GKA FRKHDI KI DPQTFS MGLS DAYLGKETQMTEAEMRQTL	80
mip(pHIT-V C5)	GKA FRKHDI KI DPQTFS MGLS DAYLGKETQMTEAEMRQTL	80
mip(Acc.No.U14170)	QQFEKQSLQKMOHKKMKQTAQQNAEKSRAFLTANKNKP GVK	120
mip(pHIT-V C5)	QQFEKQSLQKMOYKKMKQTAQQNAEKSRAFLTANKNKP GVK	120
mip(Acc.No.U14170)	TL ANGLQYKVLQAGQGQSPTLNDEVTVNYEGRLI NGTVFD	160
mip(pHIT-V C5)	TL ANGLQYKVLQAGQGQSPTLNDEVTVNYEGRLI NGTVFD	160
mip(Acc.No.U14170)	SSYKRGNPATFPLKSVI KGWQEALTRMKPGAI WEI YVPPQ	200
mip(pHIT-V C5)	SSYKRGOPATFPLKSVI KGWQEALTRMKPGAI WEI YVPPQ	200
mip(Acc.No.U14170)	LAYGEQGAPGVI GPNEALI FKVNLISVKKK.	231
mip(pHIT-V C5)	LAYGEQGAPGVI GPNEALI FKVNLISVKKKNS SVDKLAA	240
mip(Acc.No.U14170)		
mip(pHIT-V C5)	AL EHHHHHH	249

★ = Aminosäureaustausch

Abbildung 7: *Alignment* von CbMip.

Aminosäuren, die mit denen des Datenbankeintrages übereinstimmen, sind umrandet. Die unterstrichenen Aminosäuren des C-Terminus stellen die Linkersequenz des pET24b(+)-Vektors bzw. das His-tag dar.

mip (*Acc. No.* U14170) = translatierter Datenbankeintrag

mip (pHIT-V C5) = translatiertes Sequenzierungsergebnis für rCbMip

4.1.8 *mucZ*

Das Insert *mucZ* des rekombinanten Plasmids pHIT-V C6 weist eine Länge von 813 Basenpaaren auf. Der Abgleich der Sequenzierungsdaten mit dem entsprechenden Datenbankeintrag (*Acc. No.* L42518) von *mucZ* ergab vier Basenaustausche. Zwei davon erwiesen sich als still (**s. Abbildung 8**). Die Punktmutationen an Position 811 und 813 betrafen ein Codon und bedingten somit nur einen Aminosäureaustausch (STOP271N).

		AS
mucZ(Acc.No.L42518)	<u>MNWI G K L I G M M L G F I L A G P I G L I I G L F I G H V V F D Q G R F R Q</u>	40
mucZ(pHIT-V C6)	<u>MNWI G K L I G M M L G F I L A G P I G L I I G L F I G H V V F D Q G R F R Q</u>	40
mucZ(Acc.No.L42518)	<u>W F Q T T A S A R S Q P S K I Q E V F F N T T F R V M G F V A K A D G R V S E N</u>	80
mucZ(pHIT-V C6)	<u>W F Q T T A S A R S Q P S K I Q E V F F N T T F R V M G F V A K A D G R V S E N</u>	80
mucZ(Acc.No.L42518)	<u>E I R Q A R Q V M Q Q M N L D D S M K R E A I R L F T E G K Q P N F N L D E S L</u>	120
mucZ(pHIT-V C6)	<u>E I R Q A R Q V M Q Q M N L D D S M K R E A I R L F T E G K Q P N F N L D E S L</u>	120
mucZ(Acc.No.L42518)	<u>N E L R Q A C V F Q P A L L R V F L E I Q I Q M A S A D G Q G L S G Q K R Q V L</u>	160
mucZ(pHIT-V C6)	<u>N E L R Q A C V F Q P A L L R V F L E I Q I Q M A S A D G Q G L S G Q K R Q V L</u>	160
mucZ(Acc.No.L42518)	<u>Q T I C R R L E V F G F D Y N Q F E Q R F R A E Q N Y Q R Y Q Q R A T Q D P R A</u>	200
mucZ(pHIT-V C6)	<u>Q T I C R R L E V F G F D Y N Q F E Q R F R A E Q N Y Q R Y Q Q R A T Q D P R A</u>	200
mucZ(Acc.No.L42518)	<u>Y L N D A Y K V L G L T S A A T D S E I K K S Y R R L M S Q H H P D K L M A K G</u>	240
mucZ(pHIT-V C6)	<u>Y L N D A Y K V L G L T S A A T D S E I K K S Y R R L M S Q H H P D K L M A K G</u>	240
mucZ(Acc.No.L42518)	<u>L P P E M M K M A T Q K T Q Q I K K A Y E Q I R K V R S M V .</u>	271
mucZ(pHIT-V C6)	<u>L P P E M M K M A T Q K T Q Q I K K A Y E Q I R K V R S M V N S S S V D K L A A</u>	280
mucZ(Acc.No.L42518)		
mucZ(pHIT-V C6)	<u>A L E H H H H H H</u>	289

★ = Aminosäureausstausch

Abbildung 8: *Alignment* von MucZ.

Aminosäuren, die denen des Datenbankeintrages entsprachen, sind umrandet. Die unterstrichenen Aminosäuren am C-Terminus stellen die Linkersequenz des pET24b(+)-Vektors bzw. das His-tag dar.

mucZ (*Acc. No.* U42518) = translatierter Datenbankeintrag

mucZ (pHIT-V C6) = translatiertes Sequenzierungsergebnis für rMucZ

4.2 Herstellung der acht rekombinanten *C. burnetii*-Proteine

4.2.1 Expression der Histidin-markierten Fusionsproteine

Durch den Zusatz von IPTG zu einer in der logarithmischen Wachstumsphase befindlichen Kultur der *E. coli*-Klone, die die acht rekombinanten Plasmide (**vergl. Kap. 3.1.3**) trugen, konnte die Expression der Fusionsproteine (rOmp, rPmm, rHspB, rFbp, rOrf410, rCrc, rCbMip bzw. rMucZ) induziert werden. Die zur Isolierung der Fusionsproteine notwendige His-tag kodierende Sequenz befand sich beim Expressionsvektor pET15b *upstream* der Zielgene *omp*, *algC*, *htpB* und *fbp*. Durch Verwendung des Vektors pET24b(+) erfolgte bei den Genprodukten rOrf410, rCrc, rCbMip und rMucZ die Expression eines C-terminalen Histidin-Ankers.

Der Induktionserfolg ließ sich anhand von vor IPTG-Zugabe bzw. nach Beendigung der Proteininduktion entnommenen und mittels SDS-PAGE analysierter Proben verfolgen. Speziell die Expression der Fusionsproteine rOmp und rPmm bereitete zu Beginn der Untersuchungen Schwierigkeiten und war erst nach einem Wechsel der *E. coli*-Klone möglich (Daten nicht gezeigt). Der prozentuale Anteil der rekombinanten *C. burnetii*-Proteine am Gesamtproteingehalt betrug nach Abschätzung in der SDS-PAGE zwischen 10 % und 20 %. Dieser Anteil ließ sich durch die Verwendung von nicht-autoklaviertem LB-Medium verdoppeln.

4.2.2 Affinitätschromatographische Aufreinigung der acht rekombinanten Fusionsproteine

Durch die affinitätschromatographische Aufreinigung der rekombinanten *C. burnetii*-Proteine (**vergl. Kap. 3.3.1**) ließen sich Proteinkonzentrationen von ca. 0,3 mg/ml (rHspB) bis ca. 14,3 mg/ml (rOrf410) gewinnen. Daher bedurfte es teilweise Wiederholungen der Affinitätschromatographie, um die benötigte Proteinmenge von ca. 4 mg je rekombinantem Fusionsprotein bzw. der *E. coli*-Kontrollproteine zu gewinnen. Letztlich lagen zur weiteren Verwendung 3,7 mg rOmp, 4,7 mg rPmm, 7,1 mg rHspB, 7,3 mg rFbp, 6,9 mg rOrf410, 14,3 mg rCrc, 5,5 mg rCbMip, 4,2 mg rMucZ sowie 4,7 mg BL21(DE3; pET15b)- und 4,0 mg BL21[DE3; pET24b(+)]-Protein vor.

4.2.3 Nachweis und Charakterisierung der Fusionsproteine mittels SDS-PAGE und Westernblot

Obwohl für alle acht rekombinanten Fusionsproteine eine induzierbare Expression mittels SDS-PAGE und Westernblot nachgewiesen werden konnte, war die Reinheit der Fusionsproteine nach der affinitätschromatographischen Aufreinigung sehr unterschiedlich (s. **Abbildung 9**; z. B. rOmp, rCrc). Der durchschnittliche Reinheitsgrad wurde anhand der SDS-PAGE auf ca. 40 % geschätzt.

Bei Betrachtung der einzelnen Fusionsproteine fiel auf, dass rOmp ein mit ca. 23 kDa (inkl. His-tag) im Vergleich zu vorhandenen Literaturangaben (Hendrix, 1993) zu geringes Molekulargewicht aufwies (s. **Abbildung 9**; Spur 1). Dies war durch einen vorzeitigen Translationsstop infolge eines *frameshifts* (s. **Kap. 4.1.1**) bedingt. Daneben waren weitere, deutliche Proteinbanden bei ca. 50 kDa und 60 kDa zu erkennen (s. **Abbildung 9**; Spur 1). Im Westernblotverfahren erwiesen sich jedoch nur ein ca. 23 kDa und ca. 30 kDa großes Protein in der Lage, das Ni^{2+} -NTA-Peroxidasekonjugat zu binden (s. **Abbildung 10**; Spur 1).

Die Bande des Fusionsproteins rPmm war bei ca. 46 kDa neben mehreren kleinen Proteinbanden (45 kDa, 25 kDa, 20 kDa) sowohl in der SDS-PAGE als auch im Westernblot deutlich zu erkennen (s. **Abbildung 9/Abbildung 10**; jeweils Spur 2). Da die kleineren Banden ebenfalls das Ni^{2+} -NTA-Konjugat banden, wurde auf das Vorhandensein von unvollständigen Translationsprodukten in der Präparation geschlossen.

Auch für rHspB konnten neben einer dominanten Proteinbande der erwarteten Größe (62 kDa) mehrere kleinere Translationsprodukte nach Coomassie Brilliant Blau-Färbung bzw. Detektion mittels His-tag dargestellt werden (s. **Abbildung 9/Abbildung 10**; jeweils Spur 3).

Für rFbp und Orf410 konnten die rechnerisch ermittelten Molekulargewichte (20 kDa bzw. 42 kDa) experimentell bestätigt werden. Zudem waren weitere Proteinbanden nur in geringem Umfang feststellbar (s. **Abbildung 9/Abbildung 10**; jeweils Spur 4 bzw. Spur 6).

Das Fusionsprotein rCrc wies in Übereinstimmung mit den Sequenzierungsdaten (s. **Kap. 4.1.6**) in der SDS-PAGE eine Größe von ca. 26 kDa auf (s. **Abbildung 9**; Spur 7). Mittels Westernblotting wurde neben rCrc eine weitere Proteinbande bei ca. 20 kDa detektiert (s. **Abbildung 10**; Spur 7).

Für rCbMip konnte eine Größe von 23,5 kDa bestimmt werden (s. **Abbildung 9**; Spur 8). Neben dem eigentlichen rCbMip waren allerdings weitere Proteinbanden unterschiedlicher Größe darstellbar. Im Westernblot erwies sich - in Ergänzung zu rCbMip - eine dieser zusätzlichen Proteinbanden (16,5 kDa) als His-tag tragend (s. **Abbildung 10**; Spur 8).

Für rMucZ konnte in der SDS-PAGE in Übereinstimmung mit den Sequenzierungsdaten (s. **Kap. 4.1.8**) eine Größe von ca. 30 kDa festgestellt werden (s. **Abbildung 9**; Spur 9). Zusätzlich färbte sich eine weitere Proteinbande bei ca. 45 kDa mit Coomassie Brilliant Blau an. Das

Westernblotverfahren bestätigte das Molekulargewicht für rMucZ, während das 45 kDa große Protein das Ni^{2+} -NTA-Peroxidasekonjugat nicht band (s. **Abbildung 10**; Spur 9).

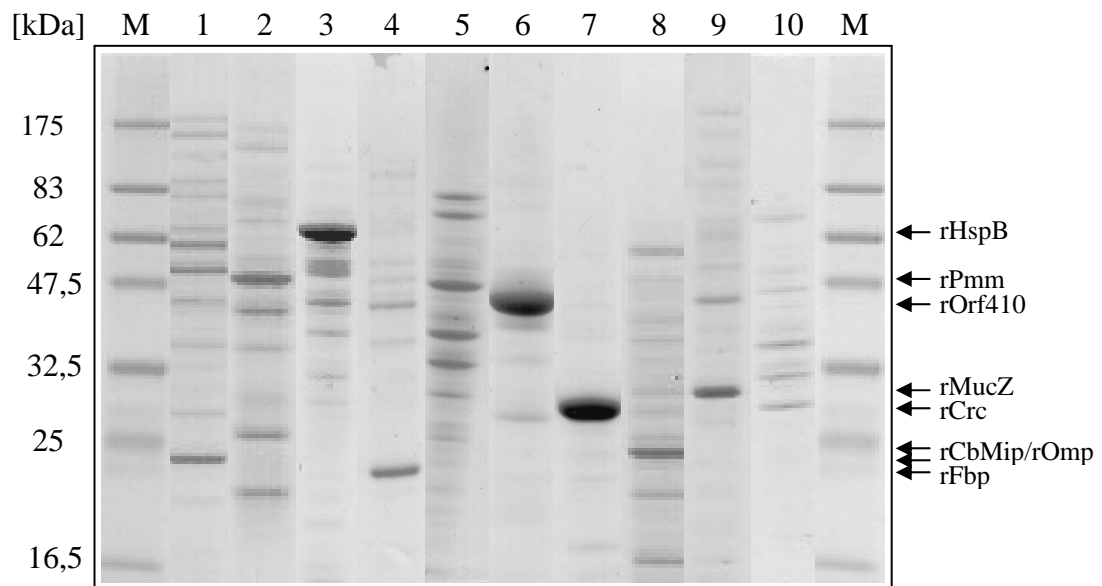


Abbildung 9: SDS-PAGE von gereinigten Fusionsproteinen und den dazugehörigen Kontrollen.

Die durch Affinitätschromatographie aufgereinigten Fusionsproteine wurden in der SDS-PAGE elektrophoretisch entsprechend ihren Molekulargewichten aufgetrennt. Als Kontrollen für die in den Proteinaufreinigungen noch enthaltenen *E. coli*-Proteine dienten entsprechende Präparationen von mit den Vektoren pET15b bzw. pET24b(+) transformierten *E. coli*-BL21(DE3).

Spur 1:	rOmp	Spur 6:	rOrf410
Spur 2:	rPmm	Spur 7:	rCrc
Spur 3:	rHspB	Spur 8:	rCbMip
Spur 4:	rFbp	Spur 9:	rMucZ
Spur 5:	BL21(DE3, pET15b)	Spur 10:	BL21[DE3, pET24b(+)]
M:	Prestained Protein Marker		

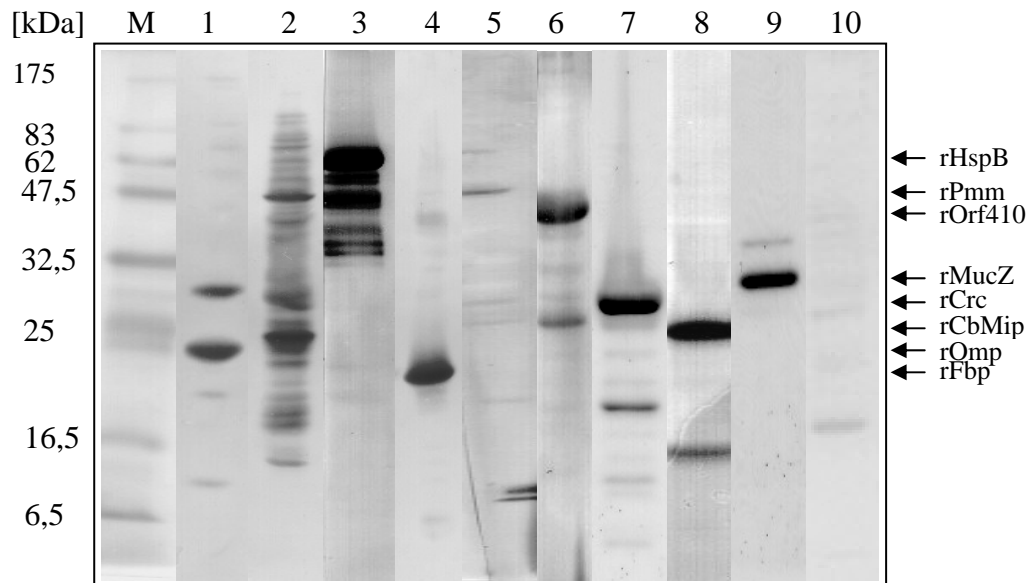


Abbildung 10: Westernblot der aufgereinigten Proteinpräparationen und der dazugehörigen Kontrollen.

Nach der SDS-PAGE (s. **Abbildung 9**) wurden die aufgetrennten Proteine auf Nitrocellulose geblottet. Die Entwicklung des Westernblots erfolgte mit Ni^{2+} -NTA-HRP Konjugat und Chloronaphtol.

Spur 1:	rOmp	Spur 6:	rOrf410
Spur 2:	rPmm	Spur 7:	rCrc
Spur 3:	rHspB	Spur 8:	rCbMip
Spur 4:	rFbp	Spur 9:	rMucZ
Spur 5:	BL21(DE3, pET15b)	Spur 10:	BL21[DE3, pET24b(+)]
M:	Prestained Protein Marker		

4.3 Überprüfung der Verträglichkeit und Immunogenität der acht rekombinanten *C. burnetii*-Proteine

Um die acht rekombinanten *C. burnetii*-Proteine auf ihre Eignung als Antigene einer *subunit*-Vakzine zu testen, wurden BALB/c-Mäuse mit diesen immunisiert und die Verträglichkeit sowie die Immunogenität der acht rekombinanten Fusionsproteine beurteilt.

4.3.1 Verträglichkeit der acht rekombinanten *C. burnetii*-Proteine

Die Mäuse zeigten über den gesamten Versuchszeitraum keine Verhaltensauffälligkeiten; Futter- und Tränkeaufnahme waren unverändert. Die wöchentlichen Gewichtskontrollen ergaben, dass die Tiere der $\text{Al}(\text{OH})_3$ -Adjuvansgruppe über den gesamten Versuchszeitraum kontinuierlich an Gewicht zunahmen, während bei den Mäusen der BAY R1005-Gruppe eine stetige Gewichtszunahme erst ab dem 14. Versuchstag (Boosterung) zu verzeichnen war (Daten nicht gezeigt).

Bedingt durch die Immunisierungen traten lokale Impfreaktionen in Form erbsen- bis kirschkerngroßer Schwellungen, Rötungen und teilweisen Fellverlusten bei den Versuchstieren beider Adjuvansgruppen auf. Entsprechend waren Abkapselungen und Abszessbildungen bei 58 % der Tiere der $\text{Al}(\text{OH})_3$ -Gruppe und 29 % der Tiere der BAY R1005-Adjuvansgruppe zu verzeichnen. Dabei wiesen die Mäuse der $\text{Al}(\text{OH})_3$ -Adjuvansgruppe im Vergleich zu den Tieren der BAY R1005-Adjuvansgruppe deutlich größere Umfangsvermehrungen auf. Unabhängig vom verwendeten Adjuvans traten bei Mäusen, die mit Proteinkombinationen immunisiert worden waren (**vergl. Kap. 3.6.3.1**), deutlich häufiger (77 %) lokale Impfreaktionen auf als bei Tieren, die mit Präparationen einzelner Proteine geimpft worden waren (25 %).

In der Sektion wiesen die Untergruppen der $\text{Al}(\text{OH})_3$ -Adjuvansgruppe, die verschiedene Kombinationen von *C. burnetii*-Proteinen erhalten hatten, erhöhte Milzgewichte (bis zu + 65 %) im Vergleich zu den übrigen Tieren auf.

4.3.2 Immunogenität der acht rekombinanten Fusionsproteine

4.3.2.1 Nachweis der Serokonversion durch Immunisierung von Mäusen mit einzelnen rekombinanten *C. burnetii*-Proteinen

Die Seren der immunisierten Mäuse (**vergl. Kap. 3.6.3.1, Tabelle 8, Tabelle 9**) wurden im Immunoblot unter Verwendung der rekombinanten *C. burnetii*-Proteine als homologe Antigene auf das Vorhandensein spezifischer Antikörper untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Applikation von einzelnen Proteinpräparationen in Verbindung mit $\text{Al}(\text{OH})_3$ die Bildung von Antikörpern gegen rOmp, rHspB, rOrf410, rCbMip und rMucZ induzierte (**s. Abbildung 11A**; Spuren 1, 3, 6, 8 und 9). Neben den Banden der Fusionsproteine wurden in den Spuren 3, 6 und 8 (rHspB, rOrf410, rCbMip) zusätzliche, kleinere Proteinbanden durch die polyklonalen Mäuseseren detektiert. Da die Molekulargewichte dieser Banden nicht denen der *E. coli*-Kontrollproteine entsprachen, wurde auf das Vorhandensein von unvollständigen Translationsprodukten in den Präparationen geschlossen, die im Rahmen der Immunisierungen ebenfalls eine humorale Immunantwort induzierten.

Die Applikation der Fusionsproteine rPmm, rFbp und rCrc rief keine humorale Immunantwort hervor (**s. Abbildung 11A**; Spuren 2, 4 und 7).

Die Immunisierung der Tiere mit den rekombinanten Proteinpräparationen in Verbindung mit **BAY R1005** als Adjuvans induzierte ebenfalls eine humorale Immunantwort gegen rOmp, rHspB, rOrf410 und rCbMip (**s. Abbildung 11B**; Spuren 1, 3, 6 und 8). Darüber hinaus war es in dieser Adjuvansgruppe möglich, eine Antikörperproduktion durch die Verimpfung des Fusionsproteins rFbp auszulösen (**s. Abbildung 11B**, Spur 4). Erneut wurden neben den eigentlichen Fusionsproteinen in

den Spuren 3, 6 und 8 unvollständige Translationsprodukte der jeweiligen rekombinanten *C. burnetii*-Proteine durch die entsprechenden polyklonalen Mäuseseren detektiert.

Eine humorale Immunantwort gegen rPmm, rCrc und rMucZ war indessen nicht nachweisbar (s. **Abbildung 11B**; Spuren 2, 7 und 9).

In den Mäuseseren, die durch Verimpfung der *E. coli*-Kontrollproteine gewonnen worden waren, konnten z. T. Antikörper nachgewiesen werden, die mit den Vektorproteinen reagierten (s. **Abbildung 11A + B**, Spuren 5 und 10). Die entsprechenden, schwach erkennbaren Banden waren ein Hinweis dafür, dass nur eine geringgradige Antikörperantwort auf die *E. coli*-Proteine erfolgte. Die Verwendung von BSA als Antigen im Immunoblot diente zudem dem Ausschluss unspezifischer Reaktionen der polyklonalen Mäuseseren mit proteinergen Antigenen (s. **Abbildung 11A + B**, Spur 11).

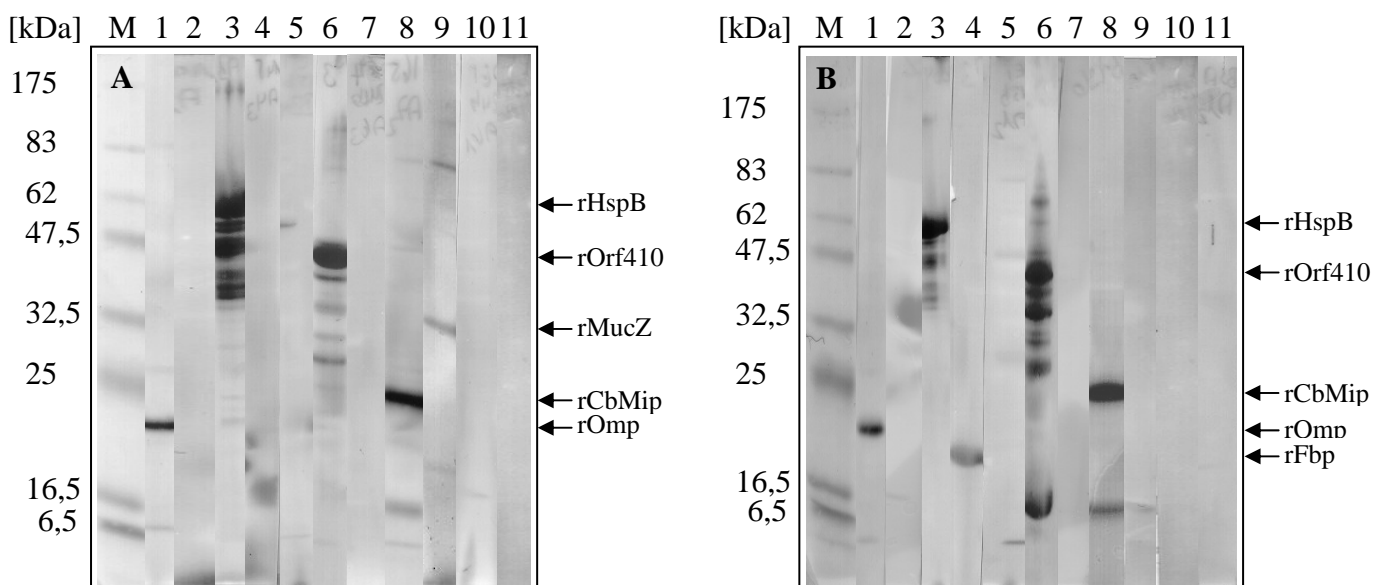


Abbildung 11: Immunoblots mit Präparationen einzelner rekombinanter *C. burnetii*-Proteine entwickelt mit murinen Seren, die ca. 14 Tage nach Immunisierung gewonnen wurden.

Blots der präparierten, rekombinanten Proteine wurden unter Verwendung von Seren entwickelt, die durch Immunisierung von Mäusen mit einzelnen rekombinanten Fusionsproteinen zusammen mit $\text{Al}(\text{OH})_3$ (**A**) bzw. BAY R1005 (**B**) als Adjuvans gewonnen worden waren. Als Antigene für den Immunoblot wurden verwendet:

Spur 1:	rOmp	Spur 6:	rOrf410
Spur 2:	rPmm	Spur 7:	rCrc
Spur 3:	rHspB	Spur 8:	rCbMip
Spur 4:	rFbp	Spur 9:	rMucZ
Spur 5:	BL21(DE3, pET15b)	Spur 10:	BL21[DE3, pET24b(+)]
M:	Prestained Protein Marker	Spur 11:	BSA

4.3.2.2 Nachweis der Serokonversion nach Immunisierung von Mäusen mit Kombinationen unterschiedlicher rekombinanter *C. burnetii*-Proteine

Die Verimpfung der rekombinanten Proteinkombination rOmp, rPmm, rHspB und rFbp (s. **Abbildung 12A**, Spuren 1 - 4) in Verbindung mit $\text{Al}(\text{OH})_3$ als Adjuvans (vergl. **Kap. 3.6.3**) induzierte eine humorale Immunantwort lediglich gegen rOmp und rHspB. Zudem waren in Spur 3 (rHspB) erneut mehrere Banden mit geringeren Molekulargewichten nachweisbar, die als unvollständige Translationsprodukte des rekombinanten Fusionsproteins rHspB angesehen wurden (s. auch **Kap. 4.2.3**).

Indessen konnte keine Antikörperbildung gegen rPmm und rFbp ausgelöst werden. Bei den im Blot erkennbaren Banden (s. **Abbildung 12A**, Spur 2 [rPmm], Spur 4 [rFbp]) handelte es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um *E. coli*-Proteine, da die Spur der *E. coli*-Kontrollpräparation (Spur 5) ein vergleichbares Bandenmuster aufwies.

Die kombinierte Verimpfung von rOrf410, rCrc, rCbMip und rMucZ (s. **Abbildung 12B**, Spuren 7-10) löste bei allen Tieren der $\text{Al}(\text{OH})_3$ -Adjuvansgruppe eine Antikörperbildung gegen rOrf410 und rCbMip aus. Neben den Banden der rekombinanten Fusionsproteine wurden erneut (s. **Kap. 4.3.2.1**) unvollständige Translationsprodukte mit Molekulargewichten von ca. 41 kDa und 29 kDa (s. **Abbildung 12B**, Spur 7) bzw. etwa 20 kDa (Spur 9) durch die polyklonalen Seren detektiert.

Die Applikation der o. g. rekombinanten Proteinkombination induzierte allerdings keine humorale Immunantwort gegen rCrc und rMucZ. In den Mäuseseren, die durch Verimpfung mit den *E. coli*-Proteinen gewonnen worden waren, konnten zudem Antikörper nachgewiesen werden, die spezifisch mit den Vektorproteinen reagierten (s. **Abbildung 12A + B**, Spuren 5 und 11). Das Auftreten entsprechender Banden in den Spuren 2 (rPmm), 4 (rFbp) und 10 (rMucZ) wies darauf hin, dass die Präparationen der rekombinanten Proteine zusätzliche, *E. coli*-spezifische Proteine enthielten.

Nach Immunisierung der Tiere mit rOmp, rPmm, rHspB, rFbp und **BAY R1005** als Adjuvans erwiesen sich nicht nur rOmp und rHspB als immunogen, sondern auch rFbp. Auffällig war allerdings, dass die Anzahl der rFbp-positiven Reagenten pro Gruppe von 100 % nach alleiniger Applikation des rekombinanten Proteins auf 25 % nach kombinierter Verimpfung der Proteine sank (s. **Tabelle 14**). Darüber hinaus detektierten die polyklonalen Mäuseseren weitere, kleinere Proteinbanden (s. **Abbildung 12C**, Spur 3 [rHspB]), bei denen es sich erneut um unvollständige Translationsprodukte des Fusionsproteins rHspB handeln dürfte (s. **Kap. 4.2.3**, **Abbildung 10**, Spur 3).

Bei der Verimpfung der o. g. Proteinkombination erwies sich lediglich rPmm als nicht immunogen. In der rOmp-Antigenpräparation (Spur 1) war zudem auffällig, dass eine ca. 6 kDa große Proteinbande durch die Mäuseseren detektiert wurde. Da vergleichbare Banden auch in den Spuren der *E. coli*-Kontrollpräparation sichtbar sind und oftmals auch in unterschiedlichen Proteinpräparationen auftraten

(s. **Abbildung 11A**, Spuren 8 [rCbMip] und 9 [rMucZ] bzw. **Abbildung 12D**, Spuren 7 [rOrf410], 9 [rCbMip] und 11 [BL21[DE3, pET24b(+)]]), handelte es sich vermutlich um *E. coli*-Proteine.

Die Seren der **BAY R1005**-Adjuvansgruppe, die durch die kombinierte Verimpfung von rOrf410, rCrc, rCbMip und rMucZ gewonnen worden waren, enthielten - im Gegensatz zu den Seren der entsprechenden Al(OH)₃-Adjuvansgruppe - Antikörper gegen alle vier rekombinanten Fusionsproteine. Die Proteine rOrf410, rCrc bzw. rMucZ induzierten allerdings nur bei 80 %, 20 % bzw. 40 % der Mäuse dieser Gruppe eine humorale Immunantwort (s. **Tabelle 14**). In den Spuren mit rOrf410 bzw. rCbMip waren zudem in Analogie zu den Immunoblots der entsprechenden Al(OH)₃-Adjuvansgruppe eine Reaktion der polyklonalen Seren mit unvollständigen Translationsprodukten (ca. 29 kDa [rOrf410, Spur 7], ca. 20 kDa [rCbMip, Spur 9]) nachweisbar (s. **Abbildung 12D**).

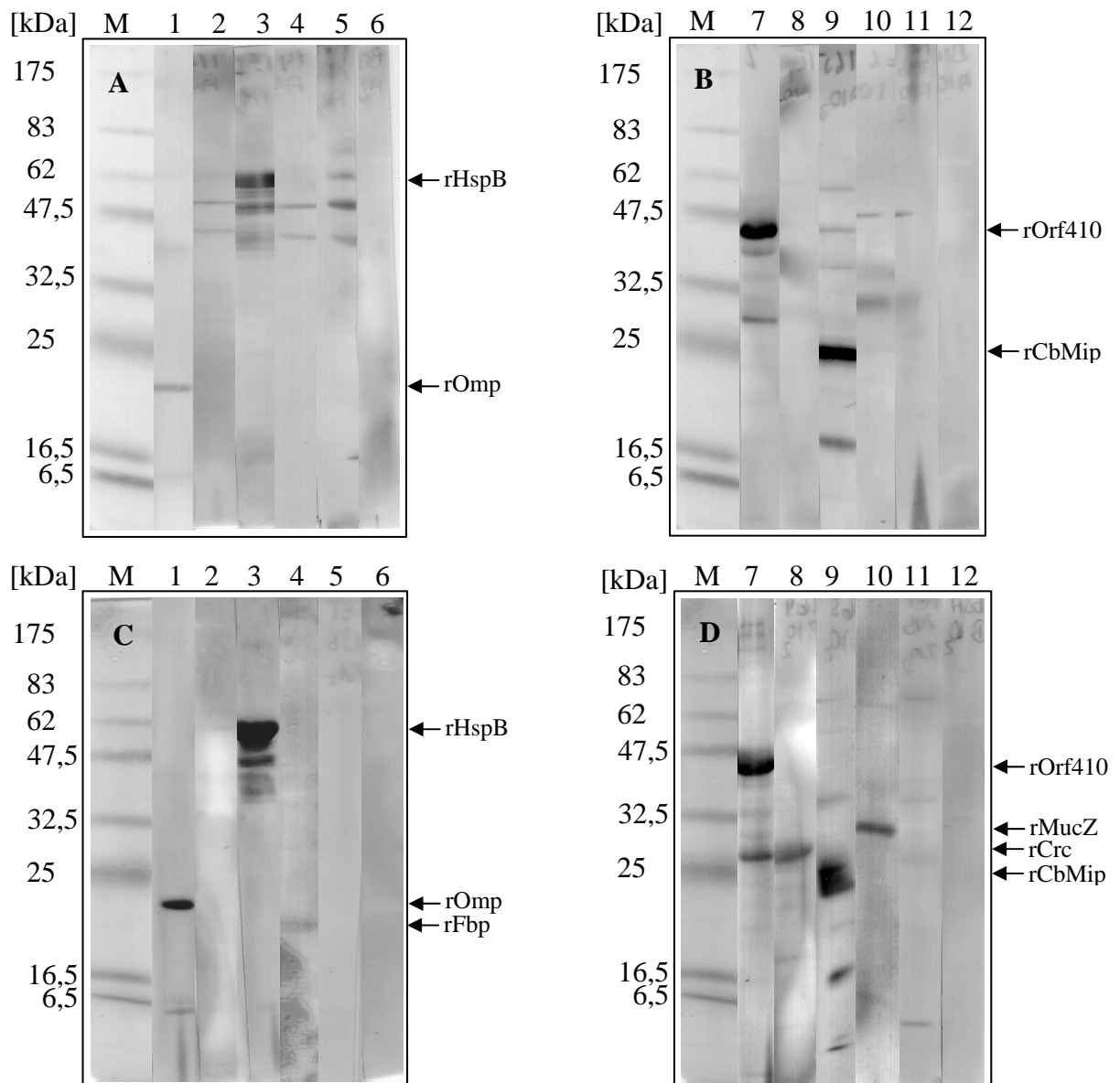


Abbildung 12: Immunoblots von rOmp, rPmm, rHspB, rFbp, rOrf410, rCrc, rCbMip und rMucZ entwickelt mit Seren, die nach Immunisierung der Mäuse mit Kombinationen bestehend aus jeweils vier der acht rekombinanten *C. burnetii*-Proteine gewonnen wurden.

Blotstreifen der präparierten rekombinanten Proteine wurden unter Verwendung von Seren entwickelt, die durch Immunisierung von Mäuse mit einer Kombination aus rOmp, rPmm, rHspB und rFbp bzw. aus rOrf410, rCrc, rCbMip und rMucZ zusammen mit den Adjuvantien $Al(OH)_3$ (A bzw. B) bzw. BAY R1005 (C bzw. D) gewonnen worden waren (für Details s. Text). Als Antigene für die Immunoblots wurden verwendet:

Spur 1:	rOmp	Spur 7:	rOrf410
Spur 2:	rPmm	Spur 8:	rCrc
Spur 3:	rHspB	Spur 9:	rCbMip
Spur 4:	rFbp	Spur 10:	rMucZ
Spur 5:	BL21(DE3, pET15b)	Spur 11:	BL21[DE3, pET24b(+)]
Spur 6/12:	BSA		
M:	Prestained Protein Marker		

Ein Kombinationspräparat aller acht rekombinanten Proteine induzierte bei den Mäusen der Al(OH)_3 -Adjuvansgruppe eine humorale Immunantwort gegen rOmp, rHspB, rOrf410, rCbMip bzw. - erstmalig und allerdings nur schwach - gegen rCrc (s. **Abbildung 13A**, Spur 1, 3, 6, 7, 8). Es war zudem nur eines der beiden diesbezüglich untersuchten Tiere (**vergl. Kap. 3.4.1**), bei dem eine Antikörperbildung gegen rCrc nachweisbar war (s. **Tabelle 14**).

Die Fusionsproteine rPmm, rFbp und rMucZ erwiesen sich in dieser Proteinkombination als nicht immunogen.

Zudem wurde erneut deutlich, dass auch gegen *E. coli*-Proteine, die in den Präparationen der rekombinanten Proteine enthalten waren, eine Antikörperantwort erfolgte. Dies legten vergleichbare Bandenmuster (ca. 47,5 kDa bzw. 6,5 kDa) in den *E. coli*-Kontrollpräparationen (s. **Abbildung 13A**, Spuren 5 und 10) bzw. in den Spuren 2 – 4, 6 und 8 (rPmm, rHspB, rFbp, rOrf410 und rCbMip) nah. Weitere, z. T. sehr deutliche Banden bzw. diffuse Verfärbungen (s. **Abbildung 13A**, z. B. Spuren 2 und 6 bzw. 7 und 9) minderten zudem die Qualität der Immunoblots. Vermutlich sind diese Verfärbungen durch unspezifische Reaktionen zwischen den Immunseren und der Nitrocellulose-Membran entstanden. Sie traten v. a. bei Blots auf, die mit Seren der Al(OH)_3 -Adjuvansgruppe entwickelt wurden.

In den entsprechenden Seren der **BAY R1005**-Adjuvansgruppe konnten Antikörper gegen rOmp, rHspB, rOrf410, rCrc, rCbMip und - ergänzend - gegen rFbp nachgewiesen werden (s. **Abbildung 13B**, Spuren 1, 3, 6, 7, 8 und 4). Allerdings enthielten nur 25 % der polyklonalen Mäuseseren Antikörper gegen rFbp und rCrc (s. **Tabelle 14**). Erneut waren bei rHspB (s. **Abbildung 13B**, Spur 3) Banden sichtbar, die auf das Vorliegen von unvollständigen Translationsprodukten schließen ließen. Die kombinierte Verimpfung der acht rekombinanten Fusionsproteine mit BAY R1005 als Adjuvans induzierte jedoch keine humorale Immunantwort gegen rPmm und rMucZ. Wiederum waren in den Blotstreifen weitere Proteinbanden nachweisbar (s. **Abbildung 13B**; z. B. Spuren 2 [rPmm], 4 [rFbp], 8 [rCbMip]), die als Reaktion der polyklonalen Mäuseseren mit in den Proteinpräparationen enthaltenen *E. coli*-Proteinen interpretiert wurden.

Insgesamt erwiesen sich - auch in Abhängigkeit vom verwendeten Adjuvans - sieben der acht rekombinanten Fusionsproteine als immunogen. Lediglich gegen das Protein rPmm war unter keiner der genutzten Versuchsbedingungen eine Antikörperbildung nachweisbar. Darüber hinaus konnte der nach Applikation von Kombinationen rekombinanter *C. burnetii*-Proteine festgestellte synergistischer Effekt in der Induktion einer humoralen Immunantwort nur durch die Nutzung von BAY R1005 weiter verstärkt werden.

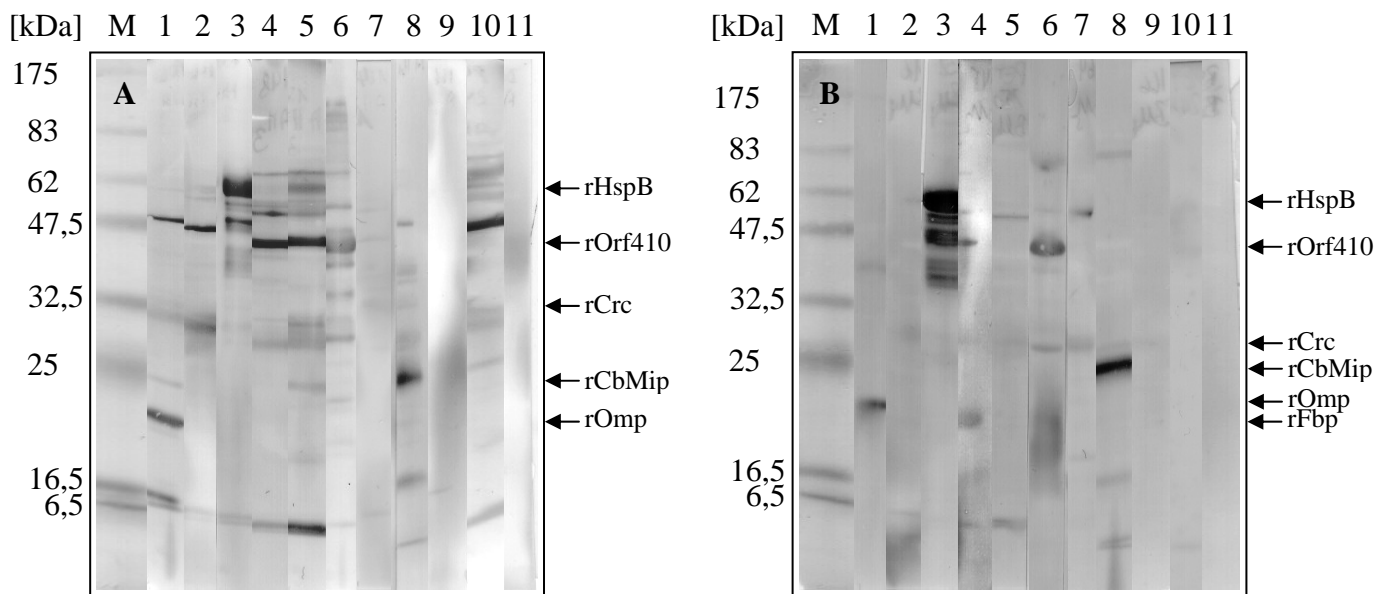


Abbildung 13: Immunoblots der acht rekombinanten *C. burnetii*-Proteine entwickelt mit Seren, die durch Immunisierung von Mäusen mit einer Kombination aus den acht Fusionproteinen gewonnen wurden.

Blots der präparierten rekombinanten Proteine wurden unter Verwendung von Seren entwickelt, die durch Immunisierung von Mäusen mit einer Kombination der acht rekombinanten *C. burnetii*-Proteine zusammen mit den Adjuvantien Al(OH)₃ (**A**) bzw. BAY R1005 (**B**) gewonnen worden waren (für Details s. Text). Als Antigene für die Immunoblots wurden verwendet:

Spur 1:	rOmp	Spur 6:	rOrf410
Spur 2:	rPmm	Spur 7:	rCrc
Spur 3:	rHspB	Spur 8:	rCbMip
Spur 4:	rFbp	Spur 9:	rMucZ
Spur 5:	BL21(DE3; pET15b)	Spur 10:	BL21[DE3; pET24b(+)]
M:	Prestained Protein Marker	Spur 11:	BSA

Tabelle 14: Antikörperbildung nach Immunisierung von Mäusen mit rekombinanten *C. burnetii*-Proteinen bei Verwendung unterschiedlicher Adjuvantien.

Adjuvans	Immunisierung mit	Antikörper nachweisbar gegen (Anzahl Reagenten/Anzahl untersuchter Seren)							
		rOmp	rPmm	rHspB	rFbp	rOrf410	rCrc	rCbMip	rMucZ
Al(OH) ₃	rOmp	4/4	-	-	-	-	-	-	-
	rPmm	-	0/3	-	-	-	-	-	-
	rHspB	-	-	2/2	-	-	-	-	-
	rFbp	-	-	-	0/2	-	-	-	-
	rOrf410	-	-	-	-	2/2	-	-	-
	rCrc	-	-	-	-	-	0/3	-	-
	rCbMip	-	-	-	-	-	-	3/3	-
	rMucZ	-	-	-	-	-	-	-	3/3
	rOmp – rFbp*	3/3	0/3	3/3	0/3	-	-	-	-
	rOrf410 – rMucZ ⁺	-	-	-	-	4/4	0/4	4/4	0/4
BAY R1005	rOmp – rMucZ [#]	2/2	0/2	2/2	0/2	2/2	1/2	2/2	0/2
	rOmp	5/5	-	-	-	-	-	-	-
	rPmm	-	0/5	-	-	-	-	-	-
	rHspB	-	-	5/5	-	-	-	-	-
	rFbp	-	-	-	5/5	-	-	-	-
	rOrf410	-	-	-	-	5/5	-	-	-
	rCrc	-	-	-	-	-	0/2	-	-
	rCbMip	-	-	-	-	-	-	5/5	-
	rMucZ	-	-	-	-	-	-	-	0/2
	rOmp – rFbp*	4/4	0/4	4/4	1/4	-	-	-	-
	rOrf410 – rMucZ ⁺	-	-	-	-	4/5	1/5	5/5	2/5
	rOmp – rMucZ [#]	4/4	0/4	4/4	1/4	4/4	1/4	4/4	0/4
	# rOmp, rPmm, rHspB, rFbp, rOrf410, rCrc, rCbMip, rMucZ								

* rOmp, rPmm, rHspB, rFbp ⁺ rOrf410, rCrc, rCbMip, rMucZ

[#] rOmp, rPmm, rHspB, Fbp, rOrf410, rCrc, rCbMip, rMucZ

4.3.2.3 Nachweis der Serokonversion im Immunoblot mit *C. burnetii*-Ganzzellantigenen

In Immunoblots wurde überprüft, inwieweit die durch Verimpfung der rekombinanten Fusionsproteine induzierten Antikörper in der Lage waren, entsprechende Proteine in *C. burnetii*-Ganzzelllysaten zu detektieren (**vergl. Kap. 3.4.1**). Die durch Immunisierung mit den rekombinanten *C. burnetii*-Proteinen in Verbindung mit $\text{Al}(\text{OH})_3$ induzierten Antikörper banden in Lysaten des Isolates Nine Mile RSA493 - unabhängig von der applizierten Proteinquantität - an die Proteine HspB und CbMip. Insgesamt reagierten 86 % der nach Applikation der rekombinanten *C. burnetii*-Proteine gewonnenen Seren mit dem homologen Protein HspB sowie 44 % der getesteten Seren mit CbMip in *C. burnetii*-Ganzzelllysaten. Eine immunologische Reaktion der polyklonalen Mäuseseren mit den Proteinen Omp, Pmm, Fbp, Orf410, Crc und MucZ konnte mit dem genutzten Versuchsaufbau (**vergl. Kap. 3.4.1**) nicht festgestellt werden. Weitergehende Untersuchungen (s. u.) waren auf Grund der geringen Serumengen nicht durchführbar.

Die Mäuseseren, die durch Immunisierung der Tiere mit **BAY R1005**-adjuvantierten rekombinanten Fusionsproteinen gewonnen worden waren, detektierten in den Ganzzelllysaten des *C. burnetii*-Isolates drei Proteine, deren Molekulargewichte denen der Fusionsproteine rOmp, rHspB bzw. rCbMip entsprachen. Darüber hinaus reagierte im Vergleich zu den $\text{Al}(\text{OH})_3$ -Gruppen ein höherer Prozentsatz der getesteten Seren mit den entsprechenden homologen Proteinen in *C. burnetii*-Ganzzelllysaten. So konnte eine immunologische Reaktion der Mäuseseren mit den natürlichen Proteinen HspB bzw. CbMip in 100 % bzw. 79 % der Fälle festgestellt werden. Hinsichtlich Omp wurde erst in weitergehenden Untersuchungen (Serumverdünnung von 1:100) bei 100 % der getesteten Seren eine Kreuzreaktivität der gegen rOmp gerichteten Antikörper mit dem homologen Protein in entsprechenden *C. burnetii*-Ganzzelllysaten nachgewiesen. Zuvor waren bei Verwendung der Standardverdünnung (**vergl. Kap. 3.4.1**) keine immunologischen Reaktionen der Seren mit dem homologen Omp in *C. burnetii*-Ganzzelllysaten zu beobachten. In den übrigen Seren ließen sich trotz weitergehender Untersuchungen (Serumverdünnung von 1:100) keine kreuzreagierenden Antikörper nachweisen.

4.4 Wirksamkeitsprüfung mit den acht rekombinanten *C. burnetii*-Proteinen als *subunit*-Vakzine im Mausinfektionsmodell

Die Ergebnisse der beiden unabhängigen Versuchsdurchführungen (vergl. Kap. 3.6.5) werden im Folgenden zusammengefasst beschrieben.

4.4.1 Entwicklung klinischer Parameter nach Infektion mit *C. burnetii*

4.4.1.1 Krankheitsverlauf *C. burnetii*-infizierter Mäuse

Bereits an Tag 1 *p. inf.* konnten in der mit rekombinanten *C. burnetii*-Proteinen immunisierten Gruppe [160 µg rPr. + BAY R1005] erste, mittelgradig ausgeprägte Symptome beobachtet werden. Von Tag 2 bis Tag 10 *p. inf.* zeigten die Mäuse ein hochgradig gestörtes Allgemeinbefinden. Anschließend trat eine stetige Besserung bis zur Gesundung der Tiere an Tag 13 ein (s. **Tabelle 15**). Bei Mäusen dieser Versuchsgruppe errechneten sich mit 4,6 ein hoher summierter klinischer Index (sKI, vergl. Kap. 3.6.5.2).

Bei den Tieren der Vakzinierungskontrolle Q-VaxTM konnten erst an Tag 2 *p. inf.* mittelgradige Krankheitssymptome beobachtet werden. Diese verstärkten sich bis Tag 3 *p. inf.* soweit, dass das Vollbild der Erkrankung sichtbar war. Ab Tag 10 *p. inf.* trat bei dieser Gruppe eine Besserung der klinischen Symptomatik auf und ab Tag 13 wurden auch sie als klinisch gesund eingestuft. Die Tiere der Vakzinierungskontrolle erhielten mit 3,9 den niedrigsten summierten klinischen Index aller Versuchsgruppen (s. **Tabelle 15**).

Ebenfalls an Tag 1 *p. inf.* zeigten die Tiere der Kontrollgruppen [*E. coli*-Pr. + BAY R1005, BAY R1005, PBS] ein mittelgradig gestörtes Allgemeinbefinden. Ihr Zustand verschlechterte sich in den folgenden Tagen, so dass von Tag 2 *p. inf.* [*E. coli*-Pr. + BAY R1005] bzw. Tag 3 *p. inf.* [BAY R1005, PBS] bis Tag 10 *p. inf.* ein hochgradig gestörtes Allgemeinbefinden vorlag (s. **Tabelle 15**). An Tag 13 *p. inf.* konnten die Tiere der *E. coli*-Pr. + BAY R1005- [Vektorkontrolle] und BAY R1005-Gruppe [Adjuvanskontrolle] zeitgleich mit den vakzinierten Gruppen [160 µg rPr. + BAY R1005, Q-VaxTM] als klinisch gesund eingestuft werden. Demgegenüber benötigten die Tiere der PBS-Gruppe [Negativkontrolle] eine dreitägige Rekonvaleszenzphase bis zu ihrer Gesundung (s. **Tabelle 15**). Die summierten klinischen Indices der drei Kontrollgruppen [*E. coli*-Pr. + BAY R1005, BAY R1005, PBS] betrugen 4,4 – 4,6 und glichen damit dem der mit den rekombinanten *C. burnetii*-Proteinen immunisierten Gruppe [160 µg rPr. + BAY R1005].

Die nicht immunisierten/infizierten Mäuse [Referenzgruppe] waren während des gesamten Beobachtungszeitraumes klinisch unauffällig und erhielten als gesunde Vergleichsgruppen einen summierten klinischen Index von 0.

Tabelle 15: Krankheitsverlauf bei Mäusen nach *i. p.*-Infektion mit $1,8 \times 10^8$ Partikeln des *C. burnetii*-Isolates Nine Mile RSA493 in Abhängigkeit von der Vorbehandlung (für Details s. Text).

Versuchsgruppen		tägliche Bewertung des Krankheitsverlaufes														sKI
vakzinierter Gruppen:																
160 µg rPr. + BAY R1005		4	6	6	6	6	6	6	6	6	6	4	2	0	0	4,6
Q-Vax TM		0	4	6	6	6	6	6	6	6	4	2	2	0	0	3,9
Kontrollen:																
E. coli-Pr. + BAY R1005		4	6	6	6	6	6	6	6	6	6	4	2	0	0	4,6
BAY R1005		4	4	6	6	6	6	6	6	6	6	4	2	0	0	4,4
PBS		4	4	6	6	6	6	6	6	6	6	4	2	2	0	4,6
nicht immunisiert/infiziert		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	Tage p. inf.

Erläuterung:

0	=	≥ 2/3 d. Tiere mit ungestörtem Allgemeinbefinden	4	=	≥ 2/3 d. Tiere mit mittelgradig gestörtem Allgemeinbefinden
2	=	≥ 2/3 d. Tiere mit geringgradig gestörtem Allgemeinbefinden	6	=	≥ 2/3 d. Tiere mit hochgradig gestörtem Allgemeinbefinden

4.4.1.2 Gewichtsentwicklung der Mäuse

Die Versuchstiere zeigten zwischen Anlieferung und Infektion mit *C. burnetii* überwiegend eine kontinuierliche und innerhalb der Versuchsgruppen vergleichbare Gewichtszunahme, die durch die Immunisierung nur vorübergehend beeinträchtigt wurde. Im Gegensatz dazu bedingte die nachfolgende Infektion mit $1,8 \times 10^8$ Partikeln des *C. burnetii*-Isolates Nine Mile RSA493 bei den Mäusen erhebliche Gewichtsverluste (s. **Abbildung 14**). Innerhalb der ersten 3 Tage *p. inf.* war der Gewichtsverlust der Tiere am größten und betrug zwischen 7 % [Q-VaxTM] und 13 % [PBS]. Während der folgenden 72 h konnte eine weitere Reduktion der Durchschnittsgewichte von 2 % [PBS] bis 4 % [QVaxTM] für die infizierten Gruppen nachgewiesen werden. Während in den folgenden Tagen die Körpergewichte der 160 µg rPr. + BAY R1005-, Q-VaxTM-, *E. coli*-Pr. + BAY R1005- und BAY R1005-Gruppe wieder anstiegen, verloren die Tiere der Negativkontrolle [PBS] weiterhin an Gewicht (1 %). Am Ende des Beobachtungszeitraumes (Tag 14 *p. inf.*) glichen die Körpergewichte der infizierten Gruppen wieder denen *prae inf.* (s. **Abbildung 14**).

Die Mäuse der Referenzgruppe (nicht immunisiert/infiziert) erwiesen sich als am schwersten (s. **Abbildung 14**), wobei v. a. gegen Ende des Beobachtungszeitraumes spontane Schwankung des Körpergewichtes von ca. 3 % auftraten (s. **Abbildung 14**).

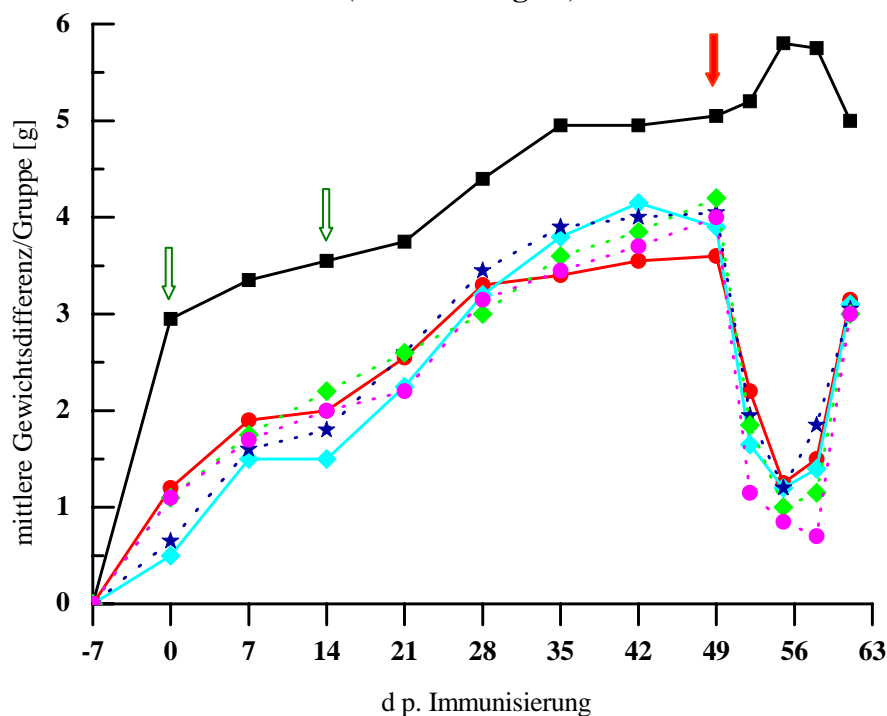
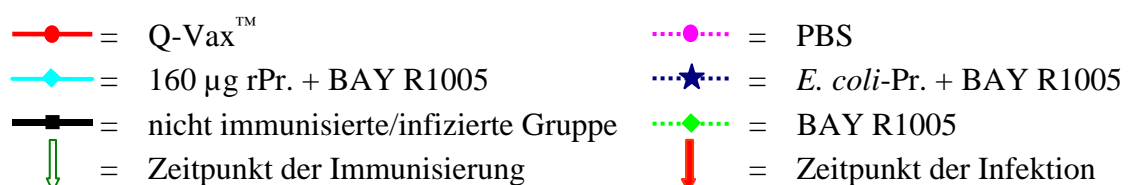


Abbildung 14: Graphische Darstellung der Gewichtsentwicklung *C. burnetii*-infizierter Mäuse in Abhängigkeit von der Vorbehandlung.



4.4.2 Entwicklung der Organgewichte

4.4.2.1 Milz

An Tag 7 *p. inf.* war bei allen infizierten Mäusen eine Splenomegalie festzustellen. Die Tiere der Gruppe, die mit rekombinanten *C. burnetii*-Proteinen immunisiert worden waren [160 µg rPr. + BAY R1005], wiesen ein durchschnittliches Milzgewicht von 0,59 g auf. Bei den Tieren der Q-VaxTM-Gruppe [Vakzinierungskontrolle] konnte ein vergleichbares durchschnittliches Milzgewicht (0,62 g) festgestellt werden (s. **Abbildung 15A**). In den Kontrollgruppen [*E. coli*-Pr. + BAY R1005, BAY R1005, PBS] differierten die durchschnittlichen Milzgewichte stärker. Während die Organgewichte der mit *E. coli*-Pr. + BAY R1005 immunisierten Gruppe (0,66 g) denen der vakzinieren Versuchgruppen ähnelte, waren bei den Mäusen der Adjuvans- (0,52 g) und der PBS-Gruppe (0,47 g) geringere, durchschnittliche Milzgewichte festzustellen. Die Tiere der nicht immunisierten und nicht infizierten Referenzgruppe wiesen mit durchschnittlich 0,11 g die geringsten Organgewichte auf (s. **Abbildung 15A**).

An Tag 14 *p. inf.* konnte ebenfalls bei allen mit *C. burnetii* infizierten Tieren eine Splenomegalie festgestellt werden, wobei sich die durchschnittlichen Milzgewichte im Vergleich zu Tag 7 *p. inf.* näherungsweise verdoppelten (Bereich: + 93 % [*E. coli*-Pr. + BAY R1005] bis + 138 % [BAY R1005], s. **Abbildung 15A**). Die Mäuse der mit 160 µg rPr. + BAY R1005 immunisierten Gruppe wiesen dabei mit 1,31 g die höchsten, durchschnittlichen Milzgewichte auf. Im Gegensatz dazu zeichneten sich die Mäuse der Vakzinierungskontrolle Q-VaxTM durch das geringste mittlere Organgewicht aller infizierten Gruppen (0,85 g) aus. Es war signifikant geringer ($p = 0,001$) als das der 160 µg rPr. + BAY R1005-Gruppe.

Die durchschnittlichen Milzgewichte der Kontrollgruppen waren deutlich größer als an Tag 7 *p. inf.*, zeigten aber an beiden Untersuchungszeitpunkten vergleichbare Verteilungsmuster (s. **Abbildung 15A**).

4.4.2.2 Leber

An Tag 7 *p. inf.* konnte bei allen mit *C. burnetii*-infizierten Mäusen neben der Splenomegalie (s. o.) eine Hepatomegalie festgestellt werden. Die Tiere der mit 160 µg rPr. + BAY R1005 immunisierten Gruppe wiesen ein durchschnittliches Lebergewicht von 1,68 g auf. Es war mit dem für die Tiere der Vakzinierungskontrolle Q-VaxTM erhobenen Wert (1,58 g) vergleichbar (s. **Abbildung 15B**). Die durchschnittlichen Lebergewichte der Kontrollgruppen erwiesen sich mit 1,42 g [PBS] bis 1,52 g [*E. coli*-Pr. + BAY R1005] als ähnlich. Sie lagen lediglich 0,2 g bzw. 0,3 g über dem entsprechenden Wert der nicht immunisierten und nicht infizierten Referenzgruppe (s. **Abbildung 15B**).

Die an Tag 14 *p. inf.* getöteten Mäuse wiesen ebenfalls eine Hepatomegalie auf. Dabei waren die mittleren Lebergewichte bis zu 0,74 g [+ 51 %; BAY R1005-Gruppe] höher als an Tag 7 *p. inf.* (s. **Abbildung 15B**). Das höchste durchschnittliche Organgewicht (2,23 g) konnte erneut in der mit 160 µg rPr. + BAY R1005 immunisierten Tiergruppe nachgewiesen werden (s. **Abbildung 15B**). Im Gegensatz dazu wies die Q-VaxTM-Gruppe [Vakzinierungskontrolle] ein durchschnittliches Lebergewicht von lediglich 1,9 g auf. Der Unterschied erwies sich jedoch als nicht signifikant. Bei den Kontrollgruppen wurde für die Mäuse der BAY R1005-Gruppe mit 2,18 g das höchste durchschnittliche Lebergewicht bestimmt, während die *E. coli*-Pr. + BAY R1005- und die PBS-Gruppe durchschnittliche Organgewichte von 2,16 g [*E. coli*-Pr. + BAY R1005] und 1,96 g [PBS] aufwiesen.

In der Sektion an Tag 14 *p. inf.* wiesen vereinzelte Tiere der mit 160 µg rPr + BAY R1005 immunisierten Gruppe sowie der Kontrollgruppen [*E. coli*-Pr. + BAY R1005, PBS] Lebertrandnekrosen auf.

4.4.2.3 Nieren

An Tag 7 *p. inf.* variierten die durchschnittlichen Nierengewichte der mit *C. burnetii* infizierten Gruppen lediglich zwischen 0,3 g [PBS] und 0,32 g [160 µg rPr. + BAY R1005, *E. coli*-Pr. + BAY R1005] und waren somit nicht signifikant höher ($p = 0,8784$) als die der Referenzgruppe (0,29 g). Allerdings fiel auf, dass die mit rekombinanten *C. burnetii*-Proteinen vakzinierten Mäuse [160 µg rPr. + BAY R1005], sowie die Tiere, die *E. coli*-Proteine [*E. coli*-Pr. + BAY R1005] erhalten hatten, erneut die höchsten durchschnittlichen Nierengewichte aufwiesen (s. **Abbildung 15C**).

An Tag 14 *p. inf.* war lediglich eine Steigerung der durchschnittlichen Nierengewichte von + 8 % [Q-VaxTM] bis max. + 17 % [*E. coli*-Pr. + BAY R1005] zu beobachten, wobei die Organgewichte im Mittel zwischen 0,33 g [Q-VaxTM] und 0,37 g [*E. coli*-Pr. + BAY R1005] schwankten (s. **Abbildung 15C**). Somit lagen die durchschnittlichen Nierengewichte der mit *C. burnetii* infizierten Gruppen maximal 0,07 g über dem für die Referenzgruppe ermittelten Gewicht (0,3 g).

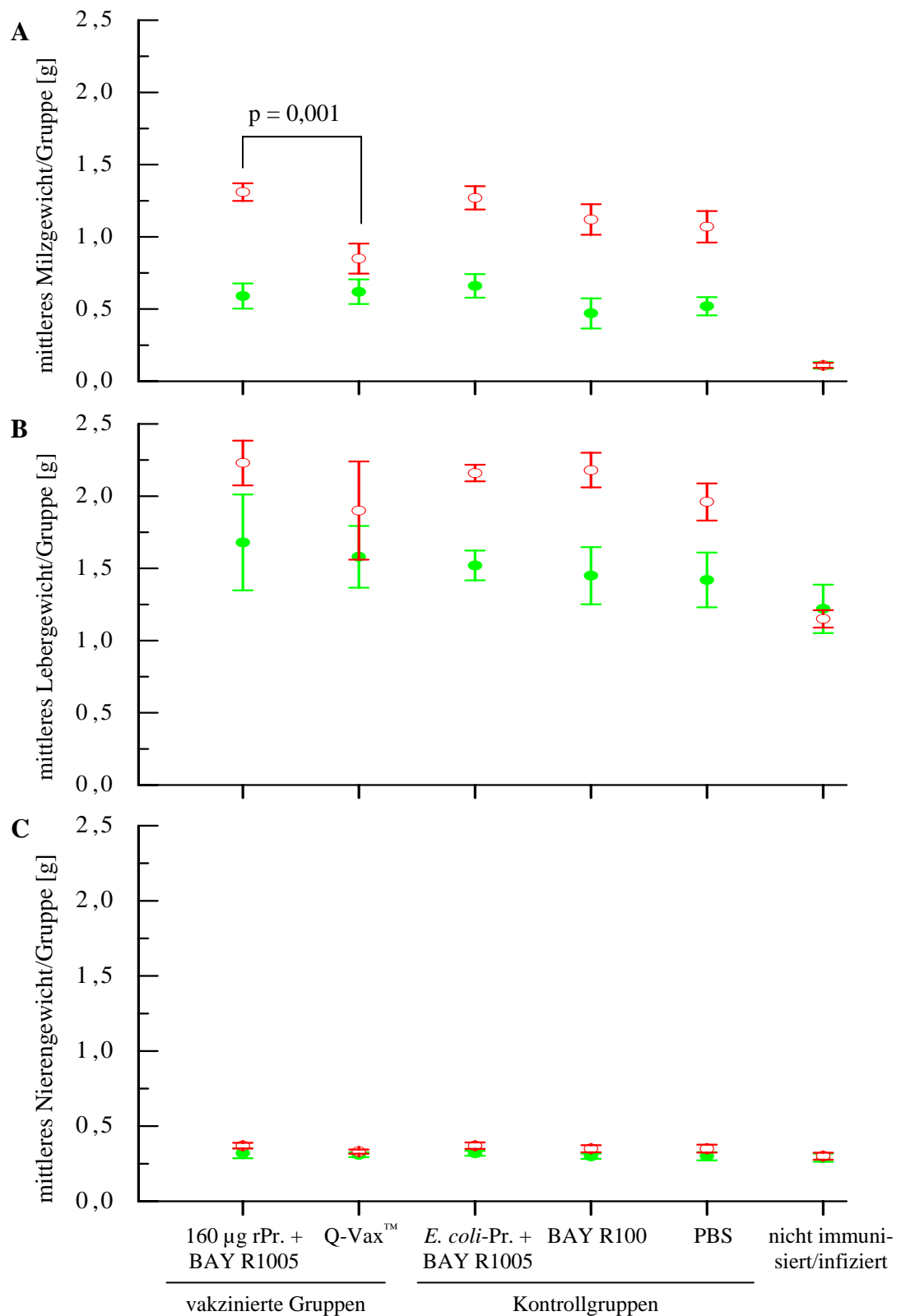


Abbildung 15: Entwicklung der Milz-, Leber- und Nierengewichte *C. burnetii*-infizierter Mäuse in Abhängigkeit von der Vorbehandlung.

(A) durchschnittliche Milzgewichte/Gruppe

(B) durchschnittliche Lebergewichte/Gruppe

(C) durchschnittliche Nierengewichte/Gruppe

● = Organgewichte an Tag 7 *p. inf.*; ○ = Organgewichte an Tag 14 *p. inf.*

4.4.3 Bestimmung des *C. burnetii*-Gehaltes in den Organen der Versuchstiere

Für die Wirksamkeitsprüfung der rekombinanten *subunit*-Vakzine wurde neben dem Krankheitsverlauf, den Gewichtsverlusten und gruppenspezifischen Organgewichten der Einfluss der Vorbehandlung auf den *C. burnetii*-Gehalt in den Organen an Tag 7 und 14 *p. inf.* herangezogen. Untersuchungsmethoden für die Erregerquantifizierung waren ein Endpunktverdünnungsverfahren zur Bestimmung der Lebendkeimzahl sowie ein TaqMan-PCR-Assay zur Bestimmung des absoluten *C. burnetii*-Gehaltes (vergl. Kap. 3.2.3.2).

4.4.3.1 Milz

Lebendkeimzahl

An Tag 7 *p. inf.* konnte bei den Tieren der mit 160 µg rPr. + BAY R1005 immunisierten Gruppe eine durchschnittliche Lebendkeimzahl von $5,3 \times 10^4$ Coxiellen pro mg Milzgewebe nachgewiesen werden (s. **Abbildung 16**). Die durchschnittliche Lebendkeimzahl der Mäuse der Vakzinierungskontrolle Q-VaxTM war mit $1,3 \times 10^5$ Partikeln pro mg Milz geringgradig höher. Für die verschiedenen Kontrollgruppen [*E. coli*-Pr. + BAY R1005, BAY R1005, PBS] betrugen die mittleren *C. burnetii*-Gehalte zwischen $1,4 \times 10^4$ [BAY R1005] und $1,6 \times 10^6$ [PBS] Coxiellen pro mg Milz. Somit waren die Lebendkeimzahlen sowohl niedriger als auch höher als bei den vakzinierten Gruppen 160 µg rPr. + BAY R1005 bzw. Q-VaxTM (s. **Abbildung 16**).

Vierzehn Tage *p. inf.* konnte sowohl für die vakzinierten Gruppen [160 µg rPr. + BAY R1005, Q-VaxTM] als auch die Kontrollgruppen *E. coli*-Pr. + BAY R1005 bzw. PBS eine Reduktion der durchschnittlichen Lebendkeimzahlen um bis zu 3 log₁₀-Stufen festgestellt werden (s. **Abbildung 16**). Für die Tiere der 160 µg rPr. + BAY R1005-Gruppe betrug der Erregergehalt $3,1 \times 10^3$ Coxiellen pro mg Milz und entsprach somit der durchschnittlichen Lebendkeimzahl der Tiere der Vakzinierungskontrolle Q-VaxTM ($2,8 \times 10^3$ Partikel/mg Milz). Für die Kontrollgruppen *E. coli*-Pr. + BAY R1005 bzw. PBS wurde ein geringerer mittlerer *C. burnetii*-Gehalt von $1,7 \times 10^3$ [*E. coli*-Pr. + BAY R1005] bzw. $7,0 \times 10^2$ [PBS] festgestellt. Im Gegensatz dazu wiesen die Tiere der BAY R1005-Adjuvansgruppe mit $1,7 \times 10^4$ Coxiellen pro mg Milz die höchste an Tag 14 *p. inf.* ermittelte Lebendkeimzahl auf (s. **Abbildung 16**). Sie bildeten somit die einzige Versuchsgruppe, bei der zwischen Tag 7 und Tag 14 *p. inf.* keine Reduktion des Erregergehaltes nachweisbar war.

TaqMan-PCR

An Tag 7 *p. inf.* waren bei den mit 160 µg rPr. + BAY R1005 immunisierten Tieren durchschnittlich $5,7 \times 10^8$ *C. burnetii*-Partikel pro mg Milzgewebe mittels TaqMan-PCR nachweisbar (s. **Abbildung 16**). Die Tiere der Vakzinierungskontrolle [Q-Vax™] wiesen mit $6,1 \times 10^7$ Partikeln pro mg Milz zwar geringere Erregergehalte auf, der Unterschied war allerdings nicht signifikant ($p = 0,1182$). Die für die Kontrollgruppen bestimmten Erregergehalte betrugen zwischen $1,1 \times 10^8$ und $8,9 \times 10^8$ *C. burnetii*-Partikeln pro mg Milz und lagen somit im Bereich der vakzinierten Gruppen.

An Tag 14 *p. inf.* war im Vergleich zu Tag 7 *p. inf.* eine deutliche Reduktion der durchschnittlichen Erregergehalte um mehr als 2 log₁₀-Stufen festzustellen (s. **Abbildung 16**). Die Tiere der mit 160 µg rPr. + BAY R1005 immunisierten Gruppe wiesen einen durchschnittlichen *C. burnetii*-Gehalt von $1,5 \times 10^6$ Partikeln pro mg Milz auf. Für die Vakzinierungskontrolle Q-Vax™ wurde mit $7,9 \times 10^5$ Genomäquivalenten je mg Organ eine vergleichbare Erregerkonzentration bestimmt. Die Erregergehalte der Kontrollgruppen waren ebenfalls vergleichbar und variierten zwischen $5,8 \times 10^5$ [BAY R1005] und $1,7 \times 10^6$ [PBS] *C. burnetii*-Partikeln pro mg Milz (s. **Abbildung 16**).

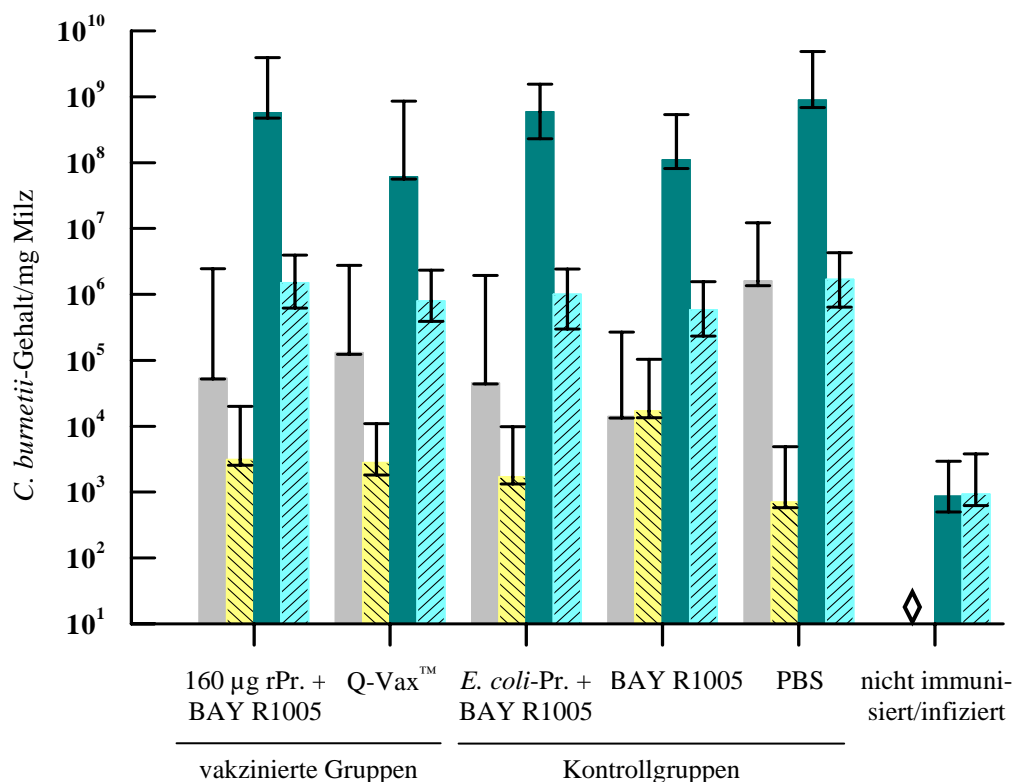


Abbildung 16: Darstellung der an Tag 7 und 14 *p. inf.* pro mg Milz ermittelten, durchschnittlichen *C. burnetii*-Gehalte. Die Fehlerbalken resultieren aus der Verrechnung mit den Streufaktoren.

- = Lebendkeimzahl Tag 7 *p. inf.*
- ▨ = Lebendkeimzahl Tag 14 *p. inf.*
- ◆ = Die Lebendkeimzahl an Tag 7 und Tag 14 *p. inf.* betrug 0
- = Genomäquivalente Tag 7 *p. inf.*
- ▨ = Genomäquivalente Tag 14 *p. inf.*

4.4.3.2 Leber

Lebendkeimzahl

An Tag 7 *p. inf.* wurden durchschnittlich $6,6 \times 10^3$ Coxiellen pro mg Leber für die Tiere der 160 µg rPr. + BAY R1005-Gruppe nachgewiesen (s. **Abbildung 17**). Demgegenüber betrug die mittlere Lebendkeimzahl der Mäuse der Vakzinierungskontrolle Q-VaxTM $6,8 \times 10^4$ *C. burnetii* pro mg Lebergewicht. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant. Bei den Mäusen der Kontrollgruppen lagen die mittleren Erregergehalte zwischen $1,2 \times 10^4$ [*E. coli*-Pr. + BAY R1005] und $5,2 \times 10^5$ [PBS] Coxiellen pro mg Leber (s. **Abbildung 17**).

Vierzehn Tage *p. inf.* konnte eine Reduktion der durchschnittlichen *C. burnetii*-Gehalte um bis zu 3 log₁₀-Stufen festgestellt werden (s. **Abbildung 17**). Dabei wiesen die Tiere der mit 160 µg rPr. + BAY R1005 immunisierten Gruppe und die der Vakzinierungskontrolle Q-VaxTM mit $2,2 \times 10^3$ Coxiellen pro mg Lebergewebe identische Lebendkeimzahlen auf. Der durchschnittliche Erregergehalt für die Kontrollgruppen lag zwischen $7,1 \times 10^2$ [PBS] und $7,1 \times 10^3$ [BAY R1005] Coxiellen pro mg Leber.

TaqMan-PCR

An Tag 7 *p. inf.* wurden für die mit 160 µg rPr. + BAY R1005 immunisierte Gruppe durchschnittlich $1,5 \times 10^7$ Genomäquivalente pro mg Lebergewebe nachgewiesen (s. **Abbildung 17**). Im Vergleich dazu war der durchschnittliche Erregergehalt der Vakzinierungskontrolle [Q-VaxTM] mit $5,7 \times 10^6$ Partikeln pro mg Leber geringgradig geringer. Der Unterschied erwies sich als nicht signifikant ($p > 0,05$). Für die mit *E. coli*-Pr. + BAY R1005, BAY R1005 bzw. PBS immunisierten Mäuse wurden *C. burnetii*-Gehalte bestimmt, die zwischen $1,5 \times 10^6$ [der *E. coli*-Pr. + BAY R1005] und $9,3 \times 10^7$ [BAY R1005] Genomäquivalenten je mg Organ variierten (s. **Abbildung 17**).

An Tag 14 *p. inf.* wiesen alle mit *C. burnetii*-infizierten Gruppen eine deutliche Reduktion des Erregergehaltes auf. Für die mit 160 µg rPr. + BAY R1005 immunisierten Mäuse wurden durchschnittlich $9,0 \times 10^4$ Partikel pro mg Lebergewebe bestimmt. Der *C. burnetii*-Gehalt war somit nicht signifikant höher als die für die Vakzinierungskontrolle Q-VaxTM ermittelte Anzahl an Genomäquivalenten ($3,9 \times 10^4$). Für die Kontrollgruppen *E. coli*-Pr. + BAY R1005, BAY R1005 bzw. PBS konnte dagegen ein mittlerer *C. burnetii*-Gehalt zwischen $3,8 \times 10^4$ und $1,1 \times 10^5$ Coxiellen pro mg Leber festgestellt werden (s. **Abbildung 17**).

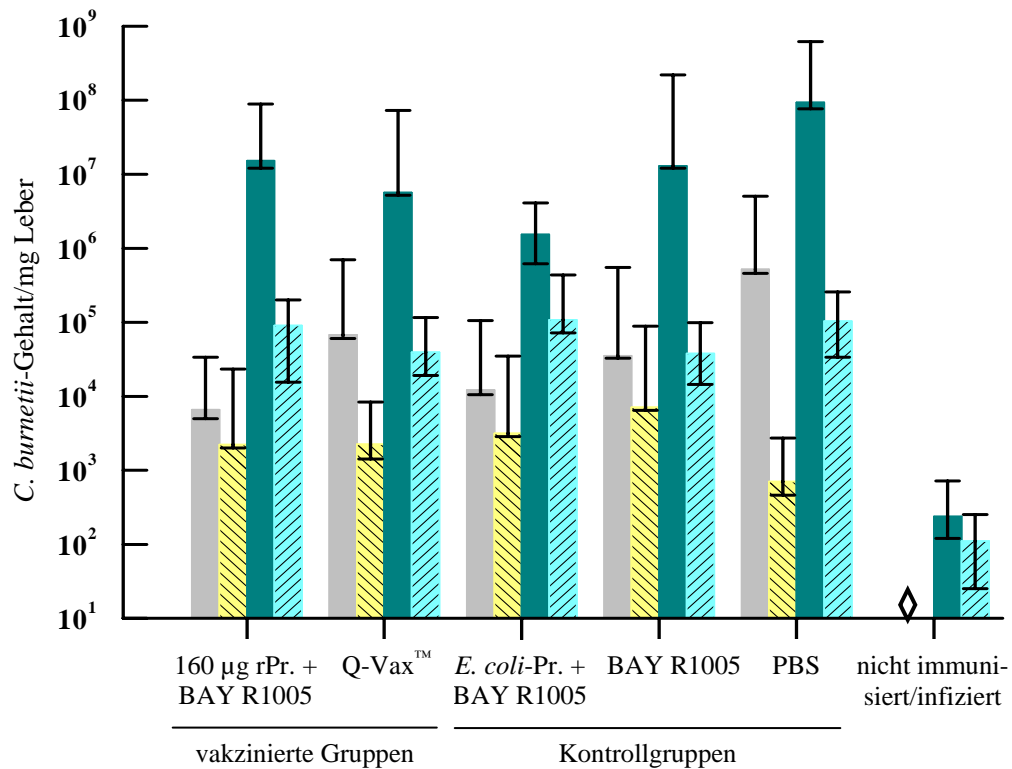


Abbildung 17: Darstellung der an Tag 7 und 14 *p. inf.* pro mg Leber bestimmten, durchschnittlichen *C. burnetii*-Gehalte. Die Fehlerbalken resultieren aus der Verrechnung mit den Streufaktoren.

- = Lebendkeimzahl Tag 7 *p. inf.* ■ = Genomäquivalente Tag 7 *p. inf.*
- ▨ = Lebendkeimzahl Tag 14 *p. inf.* ▨ = Genomäquivalente Tag 14 *p. inf.*
- ◇ = Die Lebendkeimzahl an Tag 7 und Tag 14 *p. inf.* betrug 0

4.4.3.3 Nieren

Lebendkeimzahl

An Tag 7 *p. inf.* waren bei den Tieren der mit 160 µg rPr. + BAY R1005 immunisierten Gruppe $2,7 \times 10^4$ lebende Coxiellen pro mg Niere nachweisbar (s. **Abbildung 18**). Der durchschnittliche Erregergehalt entsprach somit dem der Mäuse der Vakzinierungskontrolle Q-Vax™ ($2,3 \times 10^4$ Coxiellen/mg Niere). Die Tiere der Kontrollgruppen *E. coli*-Pr. + BAY R1005, BAY R1005 bzw. PBS wiesen zum Teil geringgradig kleinere Lebendkeimzahlen von $7,7 \times 10^3$ [*E. coli*-Pr. + BAY R1005] und $1,3 \times 10^4$ [BAY R1005] *C. burnetii* pro mg Niere, z. T. auch einen geringgradig höheren Erregergehalt von $3,5 \times 10^5$ Coxiellen je mg Organ [PBS] auf. Die festgestellten Unterschiede waren allerdings nicht signifikant.

Vierzehn Tage *p. inf.* konnte erneut für alle infizierten Gruppen eine Reduktion der Lebendkeimzahl nachgewiesen werden. Die mit 160 µg rPr. + BAY R1005 immunisierte Gruppe zeichnete sich durch

einen durchschnittlichen Erregergehalt von $6,1 \times 10^2$ Coxiellen pro mg Niere aus. Bei den Tieren der Vakzinierungskontrolle Q-VaxTM war mit durchschnittlich $4,3 \times 10^2$ infektiösen Partikeln eine vergleichbare Lebendkeimzahl pro mg Niere festzustellen (s. **Abbildung 18**). Im Gegensatz dazu wiesen die Kontrollgruppen Erregergehalte zwischen $8,5 \times 10^2$ [PBS] und $2,6 \times 10^3$ [BAY R1005] Coxiellen pro mg Niere auf.

TaqMan-PCR

Sieben Tage *p. inf.* wurde für die mit 160 µg rPr. + BAY R1005 immunisierten Tiere ein *C. burnetii*-Gehalt von $4,3 \times 10^6$ Genomäquivalente pro mg Nierengewebe festgestellt. Im Gegensatz dazu wiesen sowohl die Vakzinierungskontrolle Q-VaxTM als auch die *E. coli*-Pr. + BAY R1005- und die BAY R1005-Gruppe mit $3,1 \times 10^6$ [*E. coli*-Pr. + BAY R1005] bis $7,9 \times 10^5$ [BAY R1005] Genomäquivalenten pro mg Niere einen niedrigeren Gehalt auf (s. **Abbildung 18**). Lediglich die Tiere der PBS-Kontrollgruppe zeichneten sich durch minimal höhere Erregerkonzentrationen ($6,7 \times 10^6$ Genomäquivalenten/mg Nierengewebe) aus.

An Tag 14 *p. inf.* war in allen infizierten Gruppen eine Reduktion der *C. burnetii*-Gehalte pro mg Niere um bis zu 2 log₁₀-Stufen nachzuweisen (s. **Abbildung 18**). Mit einer Konzentration von $4,2 \times 10^4$ Genomäquivalenten pro mg Nierengewebe wurde der höchste Wert an *C. burnetii*-DNA für die mit 160 µg rPr. + BAY R1005 immunisierten Gruppe festgestellt. Eine nicht signifikant geringere Anzahl an Genomäquivalenten konnte für die Tiere der Vakzinierungskontrolle Q-VaxTM bestimmt werden ($1,2 \times 10^4$ Partikeln/mg Niere). Die Erregerkonzentrationen der Kontrollgruppen *E. coli*-Pr. + BAY R1005, BAY R1005 bzw. PBS waren mit denen der vakzinierten Gruppen vergleichbar und schwankten zwischen $1,6 \times 10^4$ [*E. coli*-Pr. + BAY R1005] und $4,2 \times 10^4$ [PBS] Genomäquivalenten pro mg Nierengewebe (s. **Abbildung 18**).

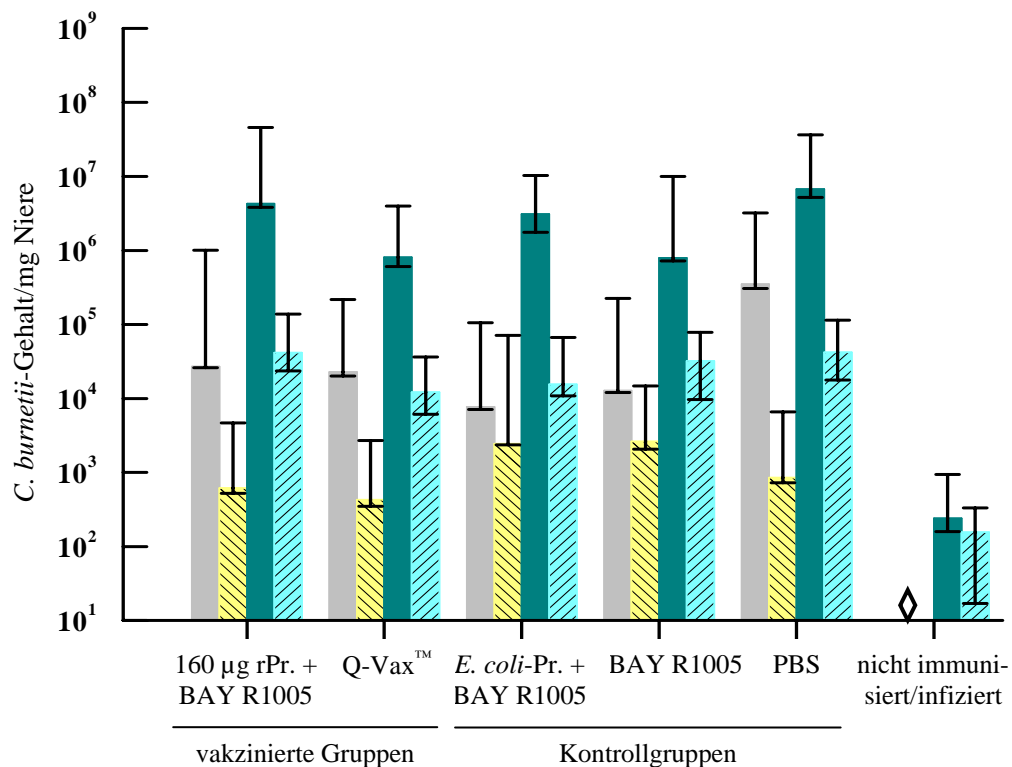


Abbildung 18: Darstellung der an Tag 7 und 14 *p. inf.* pro mg Niere bestimmten, durchschnittlichen *C. burnetii*-Gehalte. Die Fehlerbalken resultieren aus der Verrechnung mit den Streufaktoren.

- = Lebendkeimzahl Tag 7 *p. inf.* ■ = Genomäquivalente Tag 7 *p. inf.*
- ▨ = Lebendkeimzahl Tag 14 *p. inf.* ▨ = Genomäquivalente Tag 14 *p. inf.*
- ◇ = Die Lebendkeimzahl an Tag 7 und Tag 14 *p. inf.* betrug 0

Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass in allen untersuchten Organen mit beiden Nachweisverfahren an Tag 7 *p. inf.* höhere Erregergehalte pro mg Organgewicht ermittelt wurden als an Tag 14 *p. inf.*. Darüber hinaus war der mittels PCR bestimmte *C. burnetii*-Gehalt grundsätzlich höher als die Anzahl lebender Coxiellen pro mg Organgewicht. In der Milz unterschieden sich die mittels TaqMan-PCR-Assay und Lebendkeimzahlbestimmung ermittelten *C. burnetii*-Gehalte sogar um den Faktor 2. Unabhängig von diesen Unterschieden ließ sich weder für die mit 160 µg rPr. + BAY R1005 noch für die mit Q-Vax™ immunisierten Mäuse ein signifikanter Einfluss der Vorbehandlung auf den mit den verschiedenen Methoden nachweisbaren Erregergehalt in den verschiedenen Organen feststellen.

Die in den Organen der nicht mit *C. burnetii*-infizierten Tiere detektierte *Coxiella*-DNA dürfte auf Kreuzkontaminationen während der Sektion und/oder der DNA-Extraktion zurückzuführen sein. Eine Übertragung der Erreger *in vivo* war durch die Haltungsbedingungen ausgeschlossen.

5 DISKUSSION

5.1 Rekombinante Herstellung der acht *C. burnetii*-Proteine und ihre Eignung als *subunit*-Vakzine

Bisherige Versuche zur Etablierung eines *C. burnetii*-Impfstoffes verliefen wenig erfolgreich, da die Vakzinen zum Teil erhebliche Nebenwirkungen hervorriefen bzw. nicht vor einer Infektion schützten. Der Einsatz der derzeit verfügbaren Vakzinen erfordert zumindest im humanmedizinischen Bereich ein *screening*, um eine bestehende Immunität und damit einhergehende Unverträglichkeiten auszuschließen. Daher war es Gegenstand der vorliegenden Arbeit, die Eignung rekombinanter *C. burnetii*-Proteine zur Herstellung einer *subunit*-Vakzine zu überprüfen. Der große Vorteil von rekombinanten *subunit*-Vakzinen gegenüber Ganzzell-, CMR- oder aufgereinigten Protein-Impfstoffen von *C. burnetii* besteht in der einfachen, kostengünstigen und sicheren Herstellung. Das hohe Infektionsrisiko beim Herstellungsprozess durch die Kultivierung von *C. burnetii* würde z. B: auf diese Weise entfallen. Von einer solchen *subunit*-Vakzine wäre weiterhin zu fordern, dass sie gut verträglich und eine Voruntersuchung der Impflinge nicht erforderlich ist.

5.1.1 Nutzung von pET-Vektoren als Expressionssystem und Eignung der affinitätschromatographischen Aufreinigung

Für die gentechnische Herstellung der rekombinanten *C. burnetii*-Fusionsproteine wurde das kommerziell erhältliche pET-Expressionssystem gewählt. Gemäß Herstellerangaben gewährleistet dieses Expressionssystem, dass der Anteil an Fremdproteinen, in diesem Fall die rekombinanten *C. burnetii*-Proteine, bereits wenige Stunden nach Induktion bis zu 50 % des Gesamtproteingehaltes der Wirtszelle beträgt. Die Expression *E. coli*-eigener Gene soll weitestgehend unterdrückt werden (Studier, 1990; Studier, 1986). In der vorliegenden Arbeit konnte allerdings lediglich ein Fremdproteingehalt zwischen 10 % und 20 % erzielt werden. Neben den Fusionsproteinen wurden auch nach Induktion erhebliche Mengen *E. coli*-eigener Proteine nachgewiesen. Dies erwies sich für die weiteren Untersuchungen als problematisch, da zum einen der pro Induktion erzielte Fremdproteingehalt für die nachfolgenden Verwendungszwecke (Immunisierung/Infektion) zu gering war. Daraus resultierte die Notwendigkeit mehrfacher Wiederholungen. Zum anderen implizierte der Gehalt an Wirtszellproteinen die Gefahr der „Kontamination“ der durch Affinitätschromatographie gewonnenen, rekombinanten *C. burnetii*-Proteine mit *E. coli*-Proteinen. Erst durch die Verwendung von frisch

hergestelltem, nicht autoklaviertem LB-Medium gelang es, den Anteil der Fusionsproteine auf ca. 40 % des gesamten Proteingehaltes der Wirtszelle zu steigern und auf diese Weise ausreichende Mengen rekombinanter Proteine für die Immunisierungs- und Infektionsversuche zu gewinnen. Offensichtlich konnte durch die Verwendung des oben genannten Mediums die basale Transkription des T7lac-Promotors des Vektors minimiert werden. Somit war es möglich, die von den *C. burnetii*-Genprodukten ausgehende Toxizität gegenüber der Wirtszelle (Daten nicht gezeigt) zumindest vor der Induktion mittels IPTG partiell zu kompensieren.

Nach der affinitätschromatographischen Aufreinigung zeigte sich allerdings in der SDS-PAGE, dass die Fraktionen der rekombinanten *C. burnetii*-Proteine noch Spuren von *E. coli*-Proteinen enthielten (**vergl. Kap. 4.2.3**). Eine solche, unvollständige Aufreinigung His-markierter Fusionsproteine konnte bereits von anderen Autoren, die derartige Expressions- und Aufreinigungssysteme verwendeten, festgestellt werden (Barth, 2003). Um später die Spezifität der serologischen Reaktionen bzw. eine Schutzwirkung bei der Wirksamkeitsprüfung auf die rekombinanten *C. burnetii*-Proteine zurückführen zu können, wurde zur Kontrolle sowohl im Immunisierungs- als auch im Infektionsversuch jeweils eine Tiergruppe mit *E. coli*-Proteinen vakziniert (**vergl. Kap. 4.3, 4.4**).

5.1.2 Eignung der acht rekombinanten *C. burnetii*-Proteine

Im Rahmen der Expression der rekombinanten *C. burnetii*-Proteine ließen sich alle acht Fusionsproteine erfolgreich induzieren (**vergl. Kap. 4.2.1**) und später aufgrund der gentechnischen Histidin-Markierung aus den *E. coli*-Bakterienlysaten affinitätschromatographisch aufreinigen. In der SDS-PAGE stimmten die für sieben (rPmm, rHspB, rFbp, rOrf410, rCrc, rCbMip und rMucZ) der acht His-markierten Proteine *in silico* berechneten Molekulargewichte mit den publizierten Werten (Regni, 2002, Vodkin, 1988, Farinha, 1993, MacGregor, 1996, Cianciotto, 1995, Zuber, 1995) überein und bestätigten somit die Identität der sieben Genprodukte. Für fünf der acht Genprodukte (rHspB, rFbp, rOrf410, rCrc und rMucZ) konnte zudem eine korrekte Primärstruktur durch die durchgeführten Nukleotidsequenzanalysen der rekombinanten Plasmide belegt werden (**vergl. Kap. 4.1**).

Abweichungen ergaben sich hingegen für rOmp, rPmm und rCbMip. Für das Fusionsprotein **rOmp** wurde infolge einer Basendeletion an Position 627 ein vorzeitiger Translationsstopp an Aminosäureposition 226 nachgewiesen. Die unvollständige Expression und somit ein im Vergleich zu den Literaturdaten (Burger, 1996; Hendrix, 1993) reduziertes Molekulargewicht (**vergl. Kap. 4.2.3**) wurde in der SDS-PAGE bzw. im Westernblot bestätigt: Das translatierte Protein (inkl. His-tag) wies lediglich eine Größe von ca. 22,5 kDa auf und war somit etwa 3 kDa kleiner als Omp (25,7 kDa). Dennoch erwies sich rOmp sowohl nach Verabreichung als einzelnes rekombinantes *C. burnetii*-Protein als auch nach Applikation in Kombination mit anderen rekombinanten Fusionsproteinen als

immunogen. Darüber hinaus wiesen die gegen das verkürzte rOmp gerichteten Antikörper eine Kreuzreaktivität mit dem homologen, von *C. burnetii* exprimierten Omp in *Coxiella*-Ganzzelllysaten auf (**vergl. Kap. 4.3.2.3**) und bestätigten somit die bereits von Burger publizierte Daten (Burger, 1996). Dies impliziert, dass die für die antigenen Eigenschaften von rOmp verantwortlichen T-Zell-Epitope - trotz des reduzierten Molekulargewichtes - vorhanden waren. Das rekombinante Fusionsprotein wurde folglich trotz der unvollständigen Expression für die weiteren Untersuchungen genutzt.

In **rPmm** wurde eine Mutation an Position 333 der Aminosäuresequenz festgestellt. Dass dieser Austausch von Glycin gegen Glutaminsäure ursächlich für das Ausbleiben einer humoralen Immunantwort verantwortlich war, erschien unwahrscheinlich, da antigene Epitope typischerweise von mehreren Aminosäuren gebildet werden. Mutationen einzelner Aminosäuren können allerdings die enzymatische Aktivität eines Proteins reduzieren. Zielinski konnte dies für Pmm bereits durch einen Aminosäureaustausch (R421C) in der C-terminalen Region des Proteins belegen (Zielinski, 1991).

Eine immunogene Wirkung war für das in der vorliegenden Arbeit verwendete rPmm allein aufgrund seiner Größe von 46 kDa zu vermuten. Der Hydrophilizitätsplot nach Kyte und Doolittle ergab für rPmm mehrere hydrophile Regionen, die *in silico* einen hohen Antigenitätsindex aufwiesen (Daten nicht gezeigt). Solche Regionen gelten als prädestiniert für die Erkennung durch Antikörper (Hopp, 1986). Darüber hinaus wiesen in dieser Analyse zahlreiche Abschnitte des rPmm einen amphipatischen Charakter auf, die für den Fall, dass sie stabile α -Helices bilden, nach DeLisi potentielle T-Zell-Epitope darstellen (DeLisi, 1985). Eine Ähnlichkeit von rPmm mit eukaryotischen Proteinen wurde als Erklärung für die fehlende Immunantwort durch Sequenzvergleiche mit vorhandenen Datenbankeinträgen primär ausgeschlossen (Daten nicht gezeigt). Allerdings ist aus aktuellen Untersuchungen bekannt, dass sowohl beim Mensch als auch bei der Maus Enzyme mit Phosphomannomutase-Aktivität vorkommen (Silvaggi, 2006, Cromphout, 2005). Über die Aminosäuresequenzen dieser Enzyme finden sich jedoch keinerlei Angaben, so dass ein Abgleich mit diesen Proteinen nicht durchgeführt werden konnte.

Für **rHspB** wurden im Rahmen der Nukleotidsequenzanalyse bzw. SDS-PAGE keine Abweichungen zu den publizierten Daten (Vodkin, 1988) festgestellt. Darüber hinaus erwies sich rHspB sowohl nach alleiniger Applikation als auch nach Verabreichung in Kombination mit anderen rekombinanten Fusionsproteinen bei 100 % der Versuchstiere als immunogen. Entsprechende, gegen rHspB gerichtete Antikörper wiesen zudem eine Kreuzreaktivität mit dem homologen Protein HspB aus *Coxiella*-Ganzzelllysaten auf und bestätigten somit die Beobachtungen von Vodkin (Vodkin, 1988).

Für **rFbp** wurden beim Vergleich der Sequenzierungsdaten mit vorhandenen Datenbankeinträgen ebenfalls keine Abweichungen festgestellt. Auch die SDS-PAGE bzw. der Westernblot bestätigten die für Fbp publizierte Größe von ca. 20 kDa. Eine immunogene Wirkung des rFbp war allerdings nur teilweise nachweisbar. So reagierten sieben von 20 Tieren mit einer humoralen Immunantwort nach

Immunisierung mit rFbp. Auffällig war, dass lediglich Tiere, die rFbp in Verbindung mit BAY R1005 erhielten, Antikörper bildeten. In der Literatur ist eine immunogene Wirkung für das von *P. aeruginosa* stammende Fbp sowie für ein rekombinantes Fbp von *C. burnetii* beschrieben (Sokol, 1986/a; Thiele, 1996). Ebenso wie in der vorliegenden Arbeit war es Thiele allerdings nicht möglich, eine Kreuzreaktivität von gegen rekombinantes Fbp gerichteten Antikörpern mit dem homologen Fbp aus *Coxiella*-Ganzzelllysaten nachzuweisen. Der Autor führte die fehlende Detektion von Fbp in *Coxiella*-Ganzzelllysaten darauf zurück, dass Fbp lediglich in Eisenmangel-Situationen gebildet werde und diese bei der kulturellen Anzucht von *C. burnetii* nicht zu realisieren seien. Erst eine Tierpassage von *C. burnetii* unter simulierter Eisenmangel-Situation führte zur Expression von Fbp auf der Membranoberfläche der Bakterien und zum Nachweis der Kreuzreaktivität von gegen rFbp gerichteten Antikörpern mit dem homologen *C. burnetii*-Protein (Thiele, 1996).

Für **rOrf410** wurden zwei Mutationen an Position 410 und 411 der Aminosäuresequenz nachgewiesen. Beide Mutationen dienten der C-terminalen Fusion mit dem His-tag. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war es erstmalig möglich, Orf410 rekombinant in *E. coli* zu exprimieren (**vergl. Kap. 4.2.1**) und durch Immunisierung von Mäusen mittels adjuvantiertem rOrf410 eine Antikörperbildung zu induzieren (**vergl. Kap. 4.3.2**). Eine Kreuzreaktivität der gegen rOrf410 gerichteten Antikörper mit dem homologen *C. burnetii*-Protein in *Coxiella*-Ganzzelllysaten konnte allerdings nicht nachgewiesen werden. Es ist zu vermuten, dass Orf410 als Homologon eines von *B. subtilis* stammenden Integrase/Rekombinase-Proteins nur in sehr geringem Umfang exprimiert wird. Somit wäre eine spezifische Reaktion der gegen rOrf410 gerichteten Antikörper mit dem homologen Protein von *C. burnetii* aufgrund der Nachweisgrenze im Immunoblot nicht darstellbar.

Für das Fusionsprotein **rCrc** wurden zwei Mutationen innerhalb der Aminosäuresequenz festgestellt, die - in Analogie zu rOrf410 - der Fusion mit dem Histidin-Anker dienten. Auch hier war erstmalig der Nachweis einer Antikörperbildung nach Vakzinierung von Mäusen mit rCrc möglich. Allerdings fiel auf, dass die Induktion einer humoralen Immunantwort von der Art der applizierten Proteine abhing: Nur Mäuse, die eine Kombination rekombinanter *C. burnetii*-Proteine erhielten, reagierten mit einer Antikörperbildung gegen rCrc (**vergl. Kap. 4.3.2.2**). Ähnliches zeigten bereits Li *et al.*. Die Verabreichung einer Proteinkombination bestehend aus rekombinantem P1 und HspB löste eine stärkere humorale und zelluläre Immunantwort aus als die Einzelapplikation (Li, 2005). Die Detektion von Crc in *Coxiella*-Ganzzelllysaten durch die gegen rCrc gerichteten Antikörper gelang im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht. Demgegenüber gibt es in der Literatur Hinweise, dass Antikörper, die gegen das von *P. aeruginosa* stammende und in *E. coli* exprimierte Crc gerichtet waren, homologe Proteine in Ganzzelllysaten verschiedener *Pseudomonas* Stämme detektierten (MacGregor, 1996).

Bei **rCbMip** wurden insgesamt drei Mutationen nachgewiesen, wobei eine der Punktmutationen für die C-terminale Fusion mit dem His-tag erforderlich war. Demgegenüber handelte es sich bei den

Abweichungen an Position 93 (H93Y) und 167 (N167Q) um unerwünschte Aminosäureaustausche. Der Austausch einer basischen Aminosäure (H) an Position 93 durch eine aromatische (Y) sowie der Austausch von Aminosäuren mit sauren Seitenketten (N gegen Q) könnte eine Veränderung der Sekundärstruktur des Proteins bedingen. Dadurch wäre eine Modifikation antigener Epitope möglich. Im ungünstigsten Fall könnte somit die Protektivität der Immunantwort reduziert werden bzw. verloren gehen. Allerdings ist derzeit nichts über die Lage und Struktur antigener Epitope bei CbMip bekannt, so dass die möglichen Auswirkungen dieser Mutation nicht abschließend beurteilt werden können. Im Rahmen der Immunisierungsversuche induzierte rCbMip trotz der festgestellten Mutationen unter allen getesteten Versuchsbedingungen eine humorale Immunantwort bei den Versuchstieren. Ergänzend war es im Rahmen dieser Untersuchungen erstmalig möglich, eine Kreuzreaktivität der gegen rCbMip gerichteten Antikörper mit dem entsprechenden, homologen *C. burnetii*-Protein nachzuweisen (**vergl. Kap. 4.3.2.3**). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass beide Proteine über identische, zur Erkennung durch das murine Immunsystem wichtige Epitope verfügten.

Für das Fusionsprotein **rMucZ** wurde lediglich ein Aminosäureaustausch (STOP271N) nachgewiesen, der der Verbindung mit dem His-tag diene. Das Fusionsprotein rMucZ induzierte allerdings unter den getesteten Versuchsbedingungen nur bei 25 % der Versuchstiere eine humorale Immunantwort. Dieses Ergebnis ist schwer interpretierbar, da rMucZ als Chaperonin eigentlich ein Hauptziel des Immunsystems darstellen sollte. Chaperonine induzieren demnach nicht nur eine starke Antikörperantwort, sondern aktivieren bestimmte T-Zell Populationen (CD4⁺, CD8⁺ und γ/δ T-Zellen; Young, 1990), die bei der Bekämpfung obligat intrazellulärer Erreger von Bedeutung sind. Der Nachweis kreuzreagierender Antikörper war im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht möglich. Gegebenenfalls wäre zu vermuten, dass MucZ ähnlich wie Fbp nur in Stresssituationen gebildet und im Rahmen der zellkulturellen Anzucht von *C. burnetii* nicht oder nur geringgradig exprimiert wird.

Somit hatten sich sieben der acht rekombinanten *C. burnetii*-Proteine als immunogen erwiesen, v. a. wenn sie als Kombination und zusammen mit BAY R1005 an die Mäuse verimpft wurden (**vergl. Kap. 4.3.2**). Die Überprüfung der Protektivität erfolgte daher unter Verwendung einer Kombination aller acht rekombinanten *C. burnetii*-Proteine (**vergl. Kap. 3.6.5**).

5.1.3 Verträglichkeit der acht rekombinanten *C. burnetii*-Proteine

Es wurden - unabhängig vom verwendeten Adjuvans - nach Applikation der rekombinanten *C. burnetii*-Proteine in allen Tiergruppen lokale Nebenwirkungen in Form von Schwellungen beobachtet. Bei 43,5 % der Mäuse kam es zur Abszessbildung, die im Rahmen der pathologisch-anatomischen Untersuchungen bestätigt wurde (**vergl. Kap. 4.3.1**). Eine Akkumulation bedingt durch die zweimalige Injektion der Proteine in Verbindung mit Adjuvantien dürfte für die Entstehung der

Veränderungen verantwortlich gewesen sein. In anderen Studien wurden entsprechende lokale Impfreaktionen als lymphoide Hyperplasie identifiziert und auf die Immunisierung mit adjuvantierten Vakzinen zurückgeführt (Maubec, 2005). Unterschiede zwischen den rekombinanten *C. burnetii*-Proteinen in Bezug auf die Ausprägung dieser lokalen Veränderungen konnten nach Applikation als einzelne Proteine nicht festgestellt werden. Allerdings traten in den Gruppen, die Kombinationen rekombinanter *C. burnetii*-Proteine erhalten hatten, gehäuft lokale Impfreaktionen auf (**vergl. Kap. 4.3.1**). Dieser Effekt war unabhängig vom verwendeten Adjuvans und wurde auf die applizierte, relativ hohe Proteinmenge zurückgeführt. Ein solcher Zusammenhang wurde bereits von anderen Untersuchern beschrieben (Arora, 2005, Rennels, 2000).

5.1.4 Verträglichkeit bzw. Eignung der Adjuvantien

Bei Verwendung des Glycolipids BAY R1005 als Adjuvans wurden im Vergleich zu den $\text{Al}(\text{OH})_3$ -Gruppen schwächere lokale Impfreaktionen festgestellt (**vergl. Kap. 4.3.1**). Auffällig war zudem, dass bereits die alleinige Applikation von $\text{Al}(\text{OH})_3$ die festgestellten Veränderungen induzierte. Ein erhöhtes Risiko einer unerwünschten lokalen Impfreaktion bei Verwendung von $\text{Al}(\text{OH})_3$ (**vergl. Kap. 4.3.1**) wurde bereits von anderen Untersuchern, die dieses Adjuvans im Rahmen von Tierversuchen bzw. in Medikamentenstudien einsetzten, festgestellt (Maubec, 2005, Peters, 1995). In der vorliegenden Arbeit fiel zudem auf, dass bei Tiergruppen, die Kombinationen rekombinanter *C. burnetii*-Proteine in Verbindung mit $\text{Al}(\text{OH})_3$ erhalten hatten (**vergl. Kap. 4.3.1**), zusätzlich systemische Veränderungen in Form einer Splenomegalie auftraten. Ursache für die deutlich erhöhten Milzgewichte (bis zu + 65 %) dürfte eine Milzhyperplasie in Folge immunologischer Leistungssteigerung sein (Cox, 1997).

Neben der Überprüfung der Verträglichkeit der acht rekombinanten *C. burnetii*-Proteine wurde der Effekt der beiden Adjuvantien auf die immunogene Wirkung der Fusionsproteine beurteilt. Bei Einsatz von $\text{Al}(\text{OH})_3$ als Adjuvans war eine Antikörperbildung lediglich gegen sechs der acht Proteine nachweisbar. Ein positiver, synergistischer Effekt wie er für BAY R1005 beobachtet werden konnte (s. u.), war im Falle der $\text{Al}(\text{OH})_3$ -Gruppen nicht feststellbar. Im Gegensatz dazu ließ sich bei Verwendung des Adjuvans BAY R1005 gegen sieben der acht rekombinanten Proteine eine humorale Immunantwort nachweisen. Der zuvor bereits durch die Kombination der rekombinanten Proteine festgestellte synergistische Effekt in der Induktion einer Antikörperbildung (**vergl. Kap. 4.3.2.2**) konnte zudem durch die Verwendung des Adjuvans BAY R1005 verstärkt bzw. ausgeweitet werden. Aufgrund der besseren lokalen Verträglichkeit und der Induktion einer breiteren humoralen Immunantwort war BAY R1005 gegenüber $\text{Al}(\text{OH})_3$ zu bevorzugen.

5.2 Beurteilung des Tiermodells und der Bewertungsparameter

Die Maus ist das am häufigsten genutzte Tiermodell in der *C. burnetii*-Forschung. Dabei stellten sich die verschiedenen Mausstämme als unterschiedlich empfänglich gegenüber einer *C. burnetii*-Infektion dar. So entwickeln infizierte Mäuse in Abhängigkeit von der infektiösen Dosis und der verwendeten Mauslinie typische Krankheitssymptome von unterschiedlichem Schweregrad bzw. bleiben frei von klinischen Symptomen (Scott, 1987; Williams, 1985). Die für diese Arbeit genutzte BALB/c-Maus wurde als mittelgradig sensitiv für eine Infektion mit *C. burnetii* charakterisiert (Scott, 1987). Ihre Verwendung in einem subletalen Mausmodell als Alternative zu letalen Infektionsmodellen wurde durch eine andere Arbeitsgruppe bereits beschrieben (Zhang, 2004/a). Auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit erwies sich das subletale BALB/c-Mausmodell als gut geeignet, da die klinische Symptomatik bzw. die Gewichtsentwicklung *p. inf.* bereits erste Rückschlüsse auf eine Schutzwirkung der verwendeten Vakzinen zuließ. So konnte festgestellt werden, dass sich in Abhängigkeit von der Vorbehandlung die klinischen Symptome nach der Infektion mit *C. burnetii* hinsichtlich ihrer Ausprägung und Dauer unterschieden. Allerdings birgt die adspektorische Bewertung einer Erkrankung immer das Risiko der Subjektivität. Um dies in der vorliegenden Arbeit zu vermeiden, erfolgte die tägliche Beurteilung der Tiere unabhängig voneinander durch zwei Untersucher. Zudem wurden die Tiergruppen in der zweiten Versuchsdurchführung anonymisiert (**vergl. Kap. 3.6.5.1**).

Die Gewichtsentwicklung der Mäuse eignete sich ebenfalls gut für die Beurteilung der Wirksamkeit der Vakzinen; ein Vergleich der Gruppen war leicht und objektiv möglich. Als Beurteilungsparameter spiegelte die Gewichtsentwicklung der Tiergruppen die Futteraufnahme und somit indirekt den Allgemeinzustand der Tiere wieder. Nach der Infektion der immunisierten Mäuse wurden in allen Gruppen erhebliche Gewichtsverluste beobachtet, signifikante Unterschiede zwischen den unterschiedlich vorbehandelten Gruppen ließen sich jedoch im Rahmen der Gewichtskontrollen nicht feststellen.

Neben der klinischen Symptomatik und der Gewichtsentwicklung der Mäuse *p. inf.* wurden pathologisch-anatomische Kriterien für eine Beurteilung der Schutzwirkung der Vakzinen herangezogen. Hinsichtlich solcher Veränderungen beschrieben viele Autoren eine Splenomegalie als charakteristischen Befund nach der Infektion von Mäusen mit *C. burnetii*. Dabei korrelierte der Grad der Splenomegalie mit der verwendeten infektiösen Dosis und war umgekehrt proportional zum festgestellten Antikörpergehalt (Waag, 1997; Williams, 1982; Fromme, 1987). Die Mechanismen, die die Splenomegalie im Rahmen der *C. burnetii*-Infektion induzierten, führte Baumgärtner aufgrund histopathologischer Befunde auf infektionsbedingte Schäden zurück (Baumgärtner, 1993). Der charakteristische, pathologisch-anatomische Befund einer Splenomegalie wurde auch im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen bei allen infizierten Mäusen beobachtet. Dabei korrelierte die Milzgröße

gut mit der klinischen Symptomatik. Zudem ließen signifikante Unterschiede zwischen den Milzgewichten der unterschiedlich vorbehandelten Tiergruppen (**vergl. Kap. 4.4.2.1**) Rückschlüsse auf die Schutzwirkung der applizierten Substanzen zu. Somit erwies sich der Grad der Splenomegalie als gut geeignetes Beurteilungskriterium für die Wirksamkeitsprüfung.

Neben der Splenomegalie wurde ergänzend die Ausprägung der Hepatomegalie zur Überprüfung der Eignung der rekombinanten *C. burnetii*-Proteine als Vakzine herangezogen. Auch bezüglich dieser pathologisch-anatomischen Veränderung finden sich in der Literatur Hinweise auf eine Korrelation zwischen dem Grad der *C. burnetii*-induzierten Hepatomegalie und der Schwere der *C. burnetii*-Infektion (Williams, 1982). Als ätiologische Ursache einer solchen Hepatomegalie beschrieb Baca eine vermehrte Fetteinlagerung in die Hepatozyten (Baca, 1983). Baumgärtner wies zudem Leberläsionen in Form von Mikroabszessen und Granulomen nach (Baumgärtner, 1993). In der vorliegenden Arbeit ließen sich allerdings keine signifikanten Unterschiede zwischen den Lebergewichten der unterschiedlich vorbehandelten Tiergruppen ermitteln. Eine Korrelation zwischen der Schwere der Erkrankung und der Hepatomegalie war somit nicht feststellbar (**vergl. Kap. 4.4.2.2**).

Größenveränderungen der Nieren *p. inf.* wurden als weiterer Parameter für die Wirksamkeitsprüfung der rekombinanten *C. burnetii*-Proteine herangezogen. Sie sollten zeigen, ob die jeweilige Vorbehandlung der Mäuse einen signifikanten Einfluss auf die Organgröße ausübte. In der Literatur wurde bisher lediglich die Besiedlung des Organs mit *C. burnetii* beschrieben (Baumgärtner, 1993). Hinweise auf makroskopische, pathologisch-anatomische Veränderungen finden sich nicht. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen den Nierengewichten und der Vorbehandlung der verschiedenen Tiergruppen festgestellt werden. Allerdings wurde eine Ausscheidung des Erregers *p. inf.* mit dem Harn nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

In Ergänzung zu den oben beschriebenen Parametern diente die Quantifizierung der Erreger in Milz, Leber und Nieren als Beurteilungskriterium im Rahmen der Wirksamkeitsprüfung. Dadurch sollte der mögliche Einfluss der unterschiedlichen Vorbehandlungen auf die Ansiedlung bzw. Elimination der Erreger in bzw. aus den entsprechenden Organen erfasst werden. Um dabei zwischen infektionsfähigen und ggf. abgetöteten, aber noch nicht eliminierten Coxiellen unterscheiden zu können, erfolgte in dieser Studie erstmals die Bestimmung des Erregergehaltes pro mg Organgewicht mittels zweier Verfahren: Mit Hilfe einer quantitativen PCR wurde die absolute Erregerkonzentration bestimmt während mittels Endpunkttitration nur infektiöse Coxiellen quantifiziert wurden (**vergl. Kap. 3.2.3.2**). Beide Verfahren erwiesen sich als gut durchführbar und lieferten aussagekräftige Ergebnisse. Es konnte gezeigt werden, dass der absolute Erregergehalt durchweg höher war als die Konzentration infektionsfähiger Coxiellen. Zudem ließ sich mit beiden Verfahren eine Reduktion der Erregerlast zwischen dem 7. und 14. Tag *p. inf.* in den untersuchten Organen nachweisen. Somit erwiesen sich beide Verfahren als geeignet zur quantitativen Dokumentation der Besiedlung bzw. Elimination der

Coxiellen in bzw. aus den verschiedenen Organen. Die parallele Bestimmung des absoluten Erregergehaltes und der Lebendkeimzahl ergab in Bezug auf die eigentliche Wirksamkeitsprüfung allerdings keinen nennenswerten Erkenntniszuwachs. Folglich sollte bei zukünftigen Untersuchungen kritisch abgewogen werden, ob ein Verzicht auf die sehr arbeitsaufwändige Bestimmung der Lebendkeimzahl möglich erscheint. Zur Erfassung von eventuellen gruppenspezifischen Unterschieden in der Infektion bzw. der Infektionskinetik sollte zumeist der mittels quantitativer PCR bestimmte, absolute Erregergehalt ausreichen.

Von der für die vorliegende Arbeit genutzten infektiösen Dosis des *C. burnetii*-Isolates Nine Mile RSA493 war aus der Literatur bekannt, dass sie schwere Erkrankungssymptome verursacht und eine ausgeprägte Spleno- sowie Hepatomegalie induziert (Zhang, 2004/a; Zhang, 2003). Dabei traten Anzeichen der *C. burnetii*-induzierten Erkrankung erst drei Tage nach der Infektion auf (Zhang, 2004/a; Scott, 1987). Demgegenüber zeigten die Tiere in der vorliegenden Arbeit erste Symptome bereits an Tag 1 *p. inf.*. Dieser Unterschied lässt sich durch eine Attenuierung des Erregers infolge einer Lagerung bei -80 °C erklären. Auch eigene Arbeiten haben ergeben, dass die Virulenz der Coxiellen durch eine solche Lagerung reduziert wird und Tiere nach einer Infektion mit entsprechendem Material erst mit Verzögerung erkrankten (Daten nicht gezeigt).

Im Rahmen der in dieser Arbeit beschriebenen Infektionsversuche lag nach der zweimaligen Immunisierung der Mäuse eine Zeitspanne von fünf Wochen zwischen der Boosterung und der Infektion mit *C. burnetii*, um so den Einfluss der durch die Immunisierung stimulierten, unspezifischen Immunabwehr auf die Versuchsergebnisse zu minimieren. Solche unspezifischen Effekte traten in Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen auf, in denen die Überlebenswahrscheinlichkeit von immunisierten Mäusen, die zwei bzw. vier Wochen nach Immunisierung infiziert wurden, von ursprünglich 80 % auf später 10 % absank (Williams, 1982).

5.3 Wirksamkeitsprüfung mit den acht rekombinanten *C. burnetii*-Proteine als *subunit*-Vakzine

Für die Entwicklung einer Immunität gegenüber obligat intrazellulären Erregern wie *C. burnetii* wird die Aktivierung der zellulären Immunantwort als essenziell betrachtet (Kaufmann, 1995). Hierbei ist die Aktivierung adäquater T-Zellen vom TH₁-Zelltyp von besonderer Bedeutung. Voraussetzung für eine solche Aktivierung ist die enge Interaktion zwischen der unspezifischen und spezifischen Immunantwort, da die Differenzierung der CD4⁺-Zellen in Zellen vom TH₁- bzw. TH₂-Typ von dem zellulären Anteil des angeborenen Immunsystems reguliert wird (Norlander, 2000). Wichtige

Effektoren der zellulären Immunität sind, neben den T-Helferzellen vom TH₁-Zelltyp, zytotoxische T-Zellen, inflammatorische Zytokine wie IFN- γ und TNF- α , aktivierte Makrophagen und Natürliche Killer-Zellen. In verschiedenen Untersuchungen trugen diese Effektoren nachweislich zu einer Abschwächung der Infektion, zur Elimination der Bakterien und zur Entwicklung einer protektiven Immunität gegenüber intrazellulären Erregern wie Mykobakterien, Chlamydien, Rickettsien und Listerien bei (Igietseme, 2003). Demgegenüber wird die Rolle der erworbenen humoralen Immunantwort bei der Elimination intrazellulärer Bakterien kontrovers diskutiert. Die bekannten Antikörperfunktionen wie die Neutralisation von infektiösen Agentien sind im Falle obligat intrazellulärer Erreger wenig an der Elimination und somit der Ausbildung einer protektiven Immunantwort beteiligt. Igietseme zeigte allerdings, dass die gegen intrazelluläre Erreger induzierten Antikörper einen signifikanten, immunregulatorischen Effekt auf das zelluläre Immunsystem ausüben (Igietseme, 2003). In diesem Zusammenhang scheinen gerade Isotypen spezifischer Antikörper von besonderer Bedeutung zu sein, da sie die Aktivität der CD4⁺-Zellen vom TH₁-Typ über die Fc-Rezeptoren modulieren. Auf diese Weise wird infolge einer erleichterten Antigenaufnahme und der Präsentation von Pathogen-Antigenen die angeborene, zelluläre Immunantwort verstärkt. Darüber hinaus beteiligen sich Antikörper im Rahmen der „antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity“ zusammen mit den Natürlichen Killer-Zellen an der Kontrolle einer Infektion mit intrazellulären Erregern (Igietseme, 2003). Somit sind beide Anteile der erworbenen Immunantwort während einer Infektion mit intrazellulären Erregern von Bedeutung, wobei das Ziel die spezifische Aktivierung der zellulären Immunität sein muss (Igietseme, 2003; Kaufmann, 1995).

Die Rolle der humoralen und v. a. der zellulären Immunantwort in der Kontrolle einer *C. burnetii*-Infektion ist intensiv studiert worden. Dabei konnte eine aktivierte, zelluläre Immunantwort sowohl bei Q-Fieber Patienten als auch in mit *C. burnetii*-infizierten Tieren mittels Hauttest bzw. *in vitro* Lymphozyten-Proliferationstest nachgewiesen werden (Ascher, 1983; Jerrells, 1975). Andere Untersuchungen legten nahe, dass die Vakzination von Mäusen mit einer Ganzzellvakzine bzw. einem CMR-Impfstoff die Stimulation der zellulären Immunantwort induzierte und die Tiere vor einer tödlichen Infektion mit *C. burnetii* schützte (Waag, 1997). Es wurde zudem gezeigt, dass auch im Rahmen einer *C. burnetii*-Infektion die zellvermittelte Immunität für die Elimination der Erreger verantwortlich ist (Mege, 1997). Neben der Aktivierung der zellulären Immunantwort war zudem nach Applikation einer WCV die Induktion von Antikörper nachzuweisen, wie anhand verschiedener Untersuchungen gezeigt werden konnte (Waag, 2002; Izzo, 1993; Izzo, 1991; Izzo, 1988). Die Rolle der Antikörper im Infektionsgeschehen wird aber widersprüchlich diskutiert. Abinanti wies bereits 1957 in Untersuchungen mit Mäusen und Kaninchen „protektive“ Antikörper nach, die vor einer *C. burnetii*-Infektion schützten. Verschiedene *in vitro* Studien unterstützten diese Hypothese (Peacock, 1979; Ormsbee, 1978). Zhang hingegen stellte fest, dass Mäuse vor den Folgen einer *C. burnetii*-Infektion

nicht geschützt waren, obwohl sie Antikörper gegen immunodominante Antigene von *Coxiella* gebildet hatten (Zhang, 2003). Dies impliziert, dass Antikörper für die Kontrolle einer *C. burnetii*-Infektion *in vivo* nicht verantwortlich sind. Inwieweit allerdings Antikörper die Elimination des Erregers durch den zellulären Anteil der spezifischen Immunantwort z. B. durch Opsonierung unterstützen, wurde für *C. burnetii*-Infektionen bislang nur vermutet (Norlander, 2000).

Die für die vorliegende Arbeit ausgewählten rekombinanten *C. burnetii*-Proteine wurden im Rahmen des Immunisierungsversuches auf ihre Immunogenität getestet. Hierbei erwiesen sich sieben der acht Fusionsproteine als Antikörper-induzierend (**vergl. Kap. 4.3.2**). Allerdings ließen diese Untersuchungen keinen Rückschluss auf die Induktion einer zellulären Immunantwort zu. Um eine adäquate Kostimulation der zellulären Immunantwort und damit eine Schutzwirkung gegenüber einer *C. burnetii*-Infektion zu überprüfen, wurden immunisierte Mäuse mit einer definierten Dosis des *C. burnetii*-Isolates Nine Mile RSA493 infiziert. Von dieser Dosis war bekannt, dass sie deutliche Krankheitssymptome und eine profunde Spleno- und Hepatomegalie induziert (**vergl. Kap. 3.6.4**, Zhang, 2003). Allerdings konnte lediglich durch die Applikation der kommerziell erhältlichen, formalininaktivierten Ganzzellvakzine Q-VaxTM eine partielle Schutzwirkung erzielt werden. Diese Tiere zeigten ein verzögertes Auftreten erster Symptome, einen milderen Erkrankungsverlauf und erholten sich schneller als die übrigen Versuchsgruppen (**vergl. Kap. 4.4.1.1**). Darüber hinaus wurden in dieser Gruppe die geringsten Gewichtsverluste *p. inf.* ermittelt sowie die niedrigsten Organgewichte festgestellt (**vergl. Kap. 4.4.1.2 und Kap. 4.4.2**). Es traten keine makroskopisch sichtbaren Organläsionen auf (**vergl. Kap. 4.4.2.2**), was als zusätzlicher Hinweis auf eine partielle Schutzwirkung von Q-VaxTM gewertet wurde. Eine partielle Schutzwirkung dieser kommerziellen Vakzine war auch durch Waag beschrieben worden, der in einem letalen Mausmodell ebenfalls eine Immunisierungsdosis von 1,0 µg Q-VaxTM einsetzte (Waag, 1997). In dieser Untersuchung waren die für *C. burnetii* hoch empfänglichen A/J-Mäuse nach einmaliger Immunisierung mit Q-VaxTM vor einer aerogenen Infektion mit 1×10^7 Partikeln je Tier des *C. burnetii*-Isolates Henzerling zwar nicht vollständig geschützt, der Tod der Tiere konnte jedoch verhindert werden.

Im Gegensatz zu den Mäusen der Vakzinierungskontrolle [Q-VaxTM] konnte durch die Applikation der rekombinanten *C. burnetii*-Proteine in Verbindung mit BAY R1005 als Adjuvans bei den Mäusen kein Schutz gegenüber einer *C. burnetii*-Infektion erzielt werden. Bezüglich des Krankheitsverlaufes sowie der Gewichtsverluste *p. inf.* verhielten sich die Tiere ähnlich den infizierten Kontrollgruppen [*E. coli*-Pr. + BAY R1005, BAY R1005, PBS]. Darüber hinaus wiesen sie sieben Tage nach der Infektion ebenso wie die infizierten Kontrollgruppen eine ausgeprägte Spleno- und Hepatomegalie auf, wobei die höchsten Organgewichte an Tag 14 *p. inf.* in der 160 µg rPr. + BAY R1005-Gruppe diagnostiziert wurden (**vergl. Kap. 4.4.2**). Neben den klinischen Erkrankungssymptomen, den *p. inf.* dokumentierten

Gewichtsverlusten sowie der Spleno- und Hepatomegalie der Versuchstiere wurde während der Sektion bei vereinzelten Tieren der 160 µg rPr. + BAY R1005-Gruppe sowie den Kontrollgruppen lokale Veränderungen auf der Leberoberfläche festgestellt (**vergl. Kap. 4.4.2.2**), die im Anschnitt bis in das Leberparenchym reichten. Bei diesen Veränderungen, die im Rahmen von *C. burnetii*-Infektionen bei Mäusen bzw. nach Immunisierung von Tieren mit inaktivierten Ganzzell- bzw. einer CMR-Vakzine auch von anderen Autoren beschrieben wurden (Baumgärtner, 1993; Tokarevich, 1993; Williams, 1982), handelte es sich vermutlich um Organnekrosen. Das Auftreten solcher Nekrosen wurde im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen als weiteres Indiz für das Fehlen einer Schutzwirkung der rekombinanten *C. burnetii*-Proteine gewertet.

Hinsichtlich der Quantifizierung von *C. burnetii* in Milz, Leber und Nieren der infizierten Mäuse konnten zwischen den verschiedenen vorbehandelten Gruppen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (**vergl. Kap. 4.4.3**). Allgemein war allerdings festzustellen, dass an Tag 7 *p. inf.* in Milz, Leber und Nieren höhere Erregergehalte pro mg Organgewicht bestimmt wurden als an Tag 14 *p. inf.*. Mittels Lebendkeimzahlbestimmung wurden zudem prinzipiell geringere Partikelzahlen festgestellt als durch die quantitative PCR. Dies ist dadurch bedingt, dass bei der Beurteilung der Lebendkeimzahl vermehrungsfähige Coxiellen bestimmt wurden, was als wesentliche Stärke dieser Methode anzusehen ist. Mittels TaqMan-PCR wurde der Gesamtgehalt an *C. burnetii*-spezifischer DNA in den murinen Organproben quantifiziert.

Zusammenfassend waren somit die rekombinanten *C. burnetii*-Proteine offensichtlich nicht in der Lage, eine der inaktivierten Ganzzellvakzine Q-VaxTM vergleichbare protektive Immunantwort zu induzieren. Das Fehlen einer protektiven Wirkung wurde in früheren Vakzinierungsversuchen für einzelne rekombinante *C. burnetii*-Proteine dokumentiert (Zhang, 2003). Er immunisierte Mäuse mit vier einzelnen, rekombinanten Proteinen (rCom1, rP1, rCbMip oder rP28), die in vorangegangenen Versuchen als immunodominante Proteine der äußeren Membran (OMPs) charakterisiert worden waren (Hendrix, 1993; Varghees, 2002; Mo, 1995; Hendrix, 1990). Die Immunisierung induzierte zwar eine starke Antikörperantwort, schützte jedoch nicht vor den klinischen Folgen der *C. burnetii*-Infektion. Die Tiere zeigten eine ausgeprägte Spleno- und Hepatomegalien, wohingegen die Mäuse der Vakzinierungskontrolle (formalininaktiviertes *C. burnetii*-Isolat Nine Mile, Phase I) signifikant geringere Milzgewichte aufwiesen (Zhang, 2003).

Langel erzielte im Rahmen seiner Untersuchungen vergleichbare Ergebnisse: Zur zweimaligen, im Abstand von vier Wochen durchgeführten Immunisierung der Mäuse verwendete er verschiedene *C. burnetii*-Antigene (Proteinextrakt-, CMR- sowie ein formalininaktiviertes Vollantigen) des bovinen Isolates Frankfurt (Langel, 1987). Die intraperitoneale Infektion mit $1,4 \times 10^9$ EBE/ml erfolgte vier Wochen nach der Boosterung der Mäuse mit demselben Isolat. Als Folge zeigten die mit Proteinextrakt immunisierten Tiere ab dem dritten Tag *p. inf.* deutliche klinische Symptome. Daneben

wurde eine Spleno- und Hepatomegalie bis zu Versuchsende an Tag 21 *p. inf.* festgestellt. Bei den Tieren der Vakzinierungskontrollen war am Ende des Infektionsversuches zwar ebenfalls eine Splenomegalie zu beobachten, allerdings zeichneten sie sich gegenüber der mit Protein-Antigen immunisierten Gruppe durch ein signifikant geringeres Milzgewicht aus. Im Gegensatz dazu konnten bezüglich der Erregergehalte in den Milzen keine signifikanten Unterschiede in den unterschiedlich vorbehandelten Gruppen beobachtet werden. Bereits ab Tag 6 *p. inf.* wurde in allen Gruppen ein kontinuierlich abnehmender Erregergehalt in den Milzen festgestellt (Langel, 1987).

Fromme führte im gleichen Jahr Infektionsversuche zur Schutzwirkung einer Protein-Vakzine von *C. burnetii* durch. Die Applikation des aufgereinigten, 27 kDa großen Proteins vermittelte keinen Schutz gegenüber einer *C. burnetii*-Infektion (Fromme, 1987). Als Vakzinierungskontrolle nutzte er ebenfalls einen CMR-Impfstoff, allerdings verwendete Fromme zur Infektion der Mäuse, die 23 Tage nach der Boosterung erfolgte, $3,85 \times 10^6$ EBE/ml des *C. burnetii*-Isolates Nine Mile der Phase I.

Im Gegensatz zu den Untersuchungen durch Langel und Fromme konnte Zhang Mäuse und Meerschweinchen durch die Applikation eines partiell aufgereinigten 67 kDa großen *outer membrane proteins* des *C. burnetii*-Isolates QiYi gegenüber einem *i. p. challenge* mit einer ID₅₀ von 10^3 Coxiellen schützen (Zhang, 1994). Neben der humoralen Immunantwort wurde *in vitro* auch eine Lymphozytenproliferation nach Stimulation mit dem spezifischen Antigen nachgewiesen. Ein positiver Hypersensitivitätstest nach *s. c.* Applikation des 67 kDa großen Proteins bestätigte die Aktivierung der zellulären Immunantwort *in vivo*. Somit war dieses Protein in der Lage, beide Anteile der erworbenen Immunantwort zu stimulieren (Zhang, 1994).

Für das aufgereinigte *outer membrane protein* P1 von *C. burnetii* wurde in einem letalen Infektionsmodell ebenfalls eine protektive Wirkung beobachtet (Williams, 1990). Die Applikation des P1 Proteins induzierte zum einen eine signifikant höhere Antikörperantwort als die Verabreichung der Kontrollsubstanzen LPS und PBS. Zum anderen waren bei den mit P1 immunisierten Mäusen die Milzgewichte signifikant geringer als in den Kontrollgruppen. Auffällig war allerdings, dass die mit partiell aufgereinigtem P1 immunisierten Mäuse nicht nur Antikörper gegen Coxiellen der Phase I und Phase II entwickelten, sondern zusätzlich gegen Phase I-LPS. Aufgrund dessen wurde von den Autoren vermutet, dass protektive Antigene und/oder unspezifische Immunstimulatoren mit dem *C. burnetii*-Protein P1 aufgereinigt wurden und diese letztlich für die Schutzwirkung der Vakzine (mit-)verantwortlich waren.

Da in bisherigen Untersuchungen mit rekombinanten Proteinen (*s. o.*) bzw. Kombinationen rekombinanter *C. burnetii*-Proteine (diese Arbeit) keine protektive Wirkung induziert werden konnte, scheinen adäquate, (ko-)stimulierende Substanzen bzw. spezifische protektive Antigene in Präparationen rekombinanter *C. burnetii*-Proteine nach Expression in *E. coli* zu fehlen. Versuche dieses Problem durch die Verwendung verschiedener Adjuvantien zu umgehen, waren nicht erfolgreich

(Zhang, 2003). Dennoch deuten neuere Arbeiten darauf hin, dass rekombinante *subunit*-Vakzinen in Verbindung mit adäquaten Adjuvantien in der Lage sein können, einen messbaren Schutz gegenüber einer *C. burnetii*-Infektion zu generieren (Zhang, 2004/b). Zhang immunisierte Mäuse mit einer aufgereinigten, nicht näher beschriebenen Proteinfraktion (pI) von *C. burnetii* sowie einer Kombination aus sechs rekombinanten *C. burnetii*-Proteinen (rOmp, rP1, rCbMip, rP28, rCBU1221, rCBU17176). Die Vakzinen wurden im Rahmen der Infektionsversuche in Verbindung mit verschiedenen Adjuvantien getestet. Hierbei erwies sich inkomplettes Freund'sches Adjuvans mit unmethylierten Oligonukleotiden als das beste Applikationssystem für Proteinvakzinen in Hinblick auf die Aktivierung der humoralen sowie der zellulären Immunantwort. Beide Immunisierungsgruppen entwickelten auf diese Weise eine starke Antikörperantwort gegen Phase I- und II-Antigene von *C. burnetii* in Verbindung mit einer TH₁-dominierten, zellulären Immunantwort. Letztlich generierte die pI Proteinfraktion eine mit der Positivkontrolle WCV vergleichbare Schutzwirkung. Dagegen induzierte die Applikation der sechs rekombinanten *C. burnetii*-Proteine nur bei einem Teil der infizierten Mäuse eine protektive Wirkung (Zhang, 2004/b).

Auch in anderen Untersuchungen konnte die Wirkung einer kombinierten Applikation von rekombinanten Proteinen (rP1 und rHspB) bestätigt und auf diese Weise die Aktivierung beider Anteile des spezifischen Immunantwort erzielt werden (Li, 2005). Die Applikation einer Kombination der rekombinanten Proteine löste zudem eine stärkere humorale und zelluläre Immunantwort aus als die Verabreichung der einzelnen rekombinanten *C. burnetii*-Proteine. Die durchschnittlichen Milzgewichte der mit rP1 und rHspB immunisierten Mäuse waren signifikant geringer als die der anderen Versuchsgruppen und vergleichbar mit der Vakzinierungskontrolle WCV. Neben geringeren Milzgewichten konnte ein signifikant geringerer Gehalt an *C. burnetii*-Genomäquivalenten in der Milz festgestellt werden. Diese Ergebnisse sind ein Hinweis dafür, dass die kombinierte Applikation von rekombinanten *C. burnetii*-Proteinen die Immunantwort gegenüber einer *C. burnetii*-Infektion verbesserte. Ähnliche synergistische Effekte, die aus der kombinierten Applikation von rekombinanten *C. burnetii*-Proteinen resultierten, konnten auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit in Hinblick auf die humorale Immunantwort aufgezeigt werden: Es wurde ein Protein identifiziert (rCrc), das nach alleiniger Applikation keine Antikörperantwort induzierte, allerdings in Verbindung mit weiteren rekombinanten Proteinen immunogen wirkte (**vergl. Kap. 4.3.2.2**).

5.4 Schlussfolgerung

Zusammenfassend ist festzustellen, dass im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen keine Schutzwirkung nach einer Impfung mit rekombinanten *C. burnetii*-Proteinen festgestellt wurde. Allerdings waren auch die Tiere der Vakzinierungskontrolle nur partiell vor der Erkrankung geschützt. Die Mäuse der Q-VaxTM-Gruppe wiesen lediglich eine mildere klinische Symptomatik sowie signifikant leichtere Milzgewichte auf. Vor diesem Hintergrund wäre für weitere Wirksamkeitsprüfungen zu überlegen, ob entweder der Einsatz einer höheren Immunisierungsdosis (Scott, 1987) oder einer geringeren infektiösen Dosis indiziert ist, um zum einen das Auftreten typischer Symptome in der Vakzinierungsgruppe zu verhindern. Zum anderen könnte eine Senkung der infektiösen Dosis und eine damit verbundene mildere Belastung eine zuvor maskierte, protektive (Teil-) Wirkung der rekombinanten *C. burnetii*-Proteine erkennbar werden lassen.

Hinsichtlich der für die Wirksamkeitsprüfung verwendeten Parameter ist festzustellen, dass die klinische Symptomatik bereits für die erste Abschätzung der Schutzwirkung geeignet ist. Bei den Organgewichten ergaben sich die größten Differenzen zwischen infizierten und nicht infizierten Gruppen für die Milz. Somit war die Milz nach einer *C. burnetii*-Infektion das bei der Maus empfindlichste Organsystem. Entgegen der Auffassung anderer Untersucher (Zhang, 2003) sollte die Splenomegalie allerdings nicht als alleiniges Beurteilungskriterium herangezogen werden. Folglich ist für eine zukünftige Wirksamkeitsprüfung die Verwendung der klinischen und pathologisch-anatomischen Beurteilungsparameter zu empfehlen. Als sinnvolle Ergänzung sollte zusätzlich die Erregerquantifizierung mittels PCR als Beurteilungskriterium im Rahmen der Wirksamkeitsprüfung Verwendung finden. Auf diese Weise können gruppenspezifische Unterschiede in der Infektionskinetik einfach und schnell dargestellt werden.

Rekombinante *C. burnetii*-Proteine induzierten eine starke Antikörperantwort, waren allerdings nach Einzelapplikation bisher nicht in der Lage eine Schutzwirkung zu gewährleisten (Zhang, 2003). Obwohl nun auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine Schutzwirkung der rekombinanten *C. burnetii*-Proteine gezeigt werden konnte, stellte der Versuch, Mäuse mit einer Kombination rekombinanter *C. burnetii*-Proteine zu immunisieren, einen Fortschritt hinsichtlich der Verbesserung der Effizienz solcher Vakzinen im Hinblick auf die humorale Immunantwort dar.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Bisherige Versuche zur Etablierung eines *C. burnetii*-Impfstoffes verliefen wenig erfolgreich, da die Vakzinen zum Teil erhebliche Nebenwirkungen hervorriefen und/oder nicht schützten. Daher war es Ziel der vorliegenden Arbeit, mittels moderner molekularbiologischer Verfahren eine rekombinante *subunit*-Vakzine zu entwickeln und deren Wirksamkeit im subletalen Tiermodell zu testen.

Zu diesem Zweck wurden acht im Genom von *C. burnetii* enthaltene *orfs* mit Übereinstimmungen zu virulenzassoziierten Genen anderer pathogener Bakterienspezies für eine Klonierung in *E. coli* ausgewählt. Von vier der acht *orf*-kodierte Proteine (Omp, HspB, CbMip, MucZ) war für *C. burnetii* bekannt, dass es sich um Proteine der äußeren Zellmembran handelt. Eine membranassoziierte (Fbp) bzw. cytosolische Lokalisation (Pmm, Orf410, Crc) wurde in Analogie zu den Proteinen anderer Bakterienspezies für die übrigen vier *C. burnetii*-Proteine angenommen. Funktionell gelten sie als Regulatoren (MucZ, Crc), als Integrase/Rekombinase (Orf410), als Hitzeschockprotein (HspB) bzw. als potentiell virulenzsteigernde Proteine (Omp, Pmm, Fbp, CbMip).

Nach ihrer Klonierung wurden für drei der acht *orfs* Abweichungen in der Nukleotidsequenz festgestellt, die bei rOmp einen vorzeitigen Translationsstopp und bei rPmm bzw. rCbMip einen bzw. zwei Aminosäureaustausche bedingten. Im Anschluss an die Überexpression und Aufreinigung der His-tag tragenden Fusionsproteine erfolgte die Überprüfung ihrer Immunogenität. Dabei induzierten – mit Ausnahme von rPmm – alle rekombinanten *C. burnetii*-Proteine nach alleiniger bzw. kombinierter Verimpfung an Mäuse unter Verwendung zweier Adjuvationen (Aluminiumhydroxid, Glykolipid BAY R1005) eine humorale Immunantwort. Zudem wiesen die gegen rOmp, rHspB bzw. rCbMip gerichteten Antikörper eine Kreuzreaktivität mit homologen Proteinen in *C. burnetii*-Ganzzelllysaten auf.

Zur Überprüfung der Wirksamkeit der acht rekombinanten *C. burnetii*-Proteine als *subunit*-Vakzine wurden Mäuse mit einer Kombination aller acht Fusionsproteine in Verbindung mit dem besser verträglichen Adjuvans BAY R1005 immunisiert und anschließend mit dem *C. burnetii*-Isolat Nine Mile RSA493 infiziert ($1,8 \times 10^8$ Partikel/Tier). Dieses subletale Mausmodell erwies sich als gut geeignet, da bereits anhand des klinischen Verlaufes und der Gewichtsentwicklung *p. inf.* erste Rückschlüsse auf die Wirksamkeit der verwendeten Vakzinen möglich war. Eine Korrelation zeigte sich auch zwischen der Schutzwirkung und den Milzgewichten. Demgegenüber erwies sich die Bestimmung der Leber- bzw. Nierengewichte und die Quantifizierung der *C. burnetii*-Gehalte in Milz, Leber und Nieren als weniger aussagekräftig.

Unter Nutzung der obigen Parameter konnte nur für die Tiere der Vakzinierungskontrolle (Q-VaxTM) ein partieller Schutz gegenüber der *C. burnetii*-Infektion aufgezeigt werden. Für Mäuse, die mit der

rekombinanten *subunit*-Vakzine immunisiert worden waren, ergaben sich weder klinisch noch hinsichtlich der Organgewichte signifikante Unterschiede zu den übrigen Kontrollgruppen. Auch die *C. burnetii*-Konzentrationen in den Organen waren vergleichbar. Eine Schutzwirkung der rekombinanten *C. burnetii*-Proteine ließ sich somit nicht nachweisen. Allerdings erwies sich die Verwendung von Proteinkombinationen der Immunisierung mit einzelnen Proteinen als überlegen, da eine humorale Immunantwort gegen ein bestimmtes rekombinantes Protein (rCrc) nur nach Immunisierung mit Proteinkombinationen erfolgte.

7 SUMMARY

Previous attempts to develop Q fever vaccines were less successful in that the vaccines caused unacceptable side effects or failed to be protective. So, the aim of this study was to develop a recombinant subunit protein vaccine and to test its efficacy in a sublethal model with mice.

Eight *orfs* of *C. burnetii* were chosen for cloning in *E. coli* due to similarities with virulence associated genes of other pathogens. Four of the eight proteins encoded are known to be membrane associated in *C. burnetii* (Omp, HspB, CbMip and MucZ). For Fbp an association with the outer membrane is also assumed, whereas Pmm, Orf410, and Crc seem to be cytosolic proteins. Functionally, the eight proteins are thought to act either as facultative virulence factors (Omp, Pmm, Fbp, CbMip), as a heat shock protein (HspB), as an integrase/recombinase (Orf410), or as regulatory proteins (Crc, MucZ).

Three of the eight *orfs* cloned showed alterations in the nucleotide sequences, which caused a truncation of rOmp and induced one and two amino acids changes for rPmm and rCbMip, respectively. Subsequent to overexpression in *E. coli* and purification by affinitychromatography, the immunogenicity of the fusion proteins was tested in mice using Al(OH)₃ or the glycolipid BAY R1005 as adjuvants. Except of rPmm, the other seven proteins induced a humoral immune response either after single or combined immunization. Furthermore, antibodies directed against rOmp, rHspB, rCbMip showed cross-reactivity with their homologues in *C. burnetii* whole cell lysates.

For efficacy evaluation, mice were immunized with a combination of the eight recombinant *C. burnetii* proteins adjuvanted with BAY R1005. Five weeks after the booster immunization, mice were infected intraperitoneally with $1,8 \times 10^8$ *C. burnetii* Nine Mile RSA493 per animal. Subsequently, clinical symptoms, development of body and spleen weights proved to be adequate for indicating the efficacy of vaccination. In contrast, development of liver and kidney weight and enumeration of *C. burnetii* in spleen, liver, and kidney exhibited no correlation. Using these parameters, only mice vaccinated with Q-VaxTM were partially protected, whereas animals immunized with the recombinant *C. burnetii* proteins resembled the mock-vaccinated controls.

However, although the recombinant subunit vaccine failed to be protective, the utilization of combinations of recombinant proteins may be crucial for the development of future *C. burnetii* vaccines. In this study, the humoral immune response was more effective when the mice were immunized with combinations of the recombinant *C. burnetii* proteins.

8 LITERATURVERZEICHNIS

1. **Abinanti, F. R. and B. P. Marmion.** 1957. Protective or neutralizing antibody in Q fever. *Am J Hyg.* 66 (2): 173-195.
2. **Ackland, J. R., D. A. Worswick and B. P. Marmion.** 1994. Vaccine prophylaxis of Q fever. A follow-up study of the efficacy of Q-Vax (CSL) 1985-1990. *Med J Aust.* 160 (11): 704-708.
3. **Akporiaye, E. T., J. D. Rowatt, A. A. Aragon and O. G. Baca.** 1983. Lysosomal response of a murine macrophage-like cell line persistently infected with *Coxiella burnetii*. *Infect Immun.* 40 (3): 1155-1162.
4. **Amano, K. and J. C. Williams.** 1984. Chemical and immunological characterization of lipopolysaccharides from phase I and phase II *Coxiella burnetii*. *J Bacteriol.* 160 (3): 994-1002.
5. **Arens, M.** 1983. [Continuous multiplication of *Coxiella burnetii* through persisting infection in buffalo-green monkey (BGM) cell cultures]. *Zentralbl Veterinarmed B.* 30 (2): 109-116.
6. **Arora, S., S. Sharma, S. K. Goel and U. S. Singh.** 2005. Effect of different adjuvants in equines for the production of equine rabies immunoglobulin. *Natl Med J India.* 18 (6): 289-292.
7. **Arricau-Bouvery, N. and A. Rodolakis.** 2005. Is Q fever an emerging or re-emerging zoonosis? *Vet Res.* 36 (3): 327-349.
8. **Arricau-Bouvery, N., A. Souriau, C. Bodier, P. Dufour, E. Rousset and A. Rodolakis.** 2005. Effect of vaccination with phase I and phase II *Coxiella burnetii* vaccines in pregnant goats. *Vaccine.* 23 (35): 4392-4402.
9. **Ascher, M. S., M. A. Berman and R. Ruppanner.** 1983. Initial clinical and immunologic evaluation of a new phase I Q fever vaccine and skin test in humans. *J Infect Dis.* 148 (2): 214-222.
10. **Babudieri, B.** 1959. Q fever: a zoonosis. *Adv. Vet. Sci.:* 81.
11. **Baca, O. G. and D. Paretsky.** 1983. Q fever and *Coxiella burnetii*: a model for host-parasite interactions. *Microbiol Rev.* 47 (2): 127-149.
12. **Baca, O. G.** 1988. Surface antigens of *Coxiella burnetii*. D. H. Walker, Boca Raton, U. S. A.: CRC Press.

13. **Baca, O. G.** 1989. Persistent infection with *Coxiella burnetii* *in vitro* and *in vivo*. J. W. Moulder, Boca Raton, U. S. A.: CRC Press.
14. **Baca, O. G., Y.-P. Li, and H. Kumar.** 1994. Survival of the Q fever agent *Coxiella burnetii* in the phagolysosome. Trends in Microbiology. 2 (12): 476-480
15. **Barth, S.** 2003. Untersuchung zur immunologischen Bedeutung des Virulenzfaktors SpvD von *Salmonella enterica*. Giessen: Dissertationsschrift vet. med.
16. **Baumgärtner, W., H. Dettinger and N. Schmeer.** 1993. Spread and distribution of *Coxiella burnetii* in C57BL/6J (H-2b) and Balb/cJ (H-2d) mice after intraperitoneal infection. J Comp Pathol. 108 (2): 165-184.
17. **Behymer, D. E., E. L. Biberstein, H. P. Riemann, C. E. Franti, M. Sawyer, R. Ruppanner and G. L. Crenshaw.** 1976. Q fever (*Coxiella burnetii*) investigations in dairy cattle: challenge of immunity after vaccination. Am J Vet Res. 37 (6): 631-634.
18. **Bell, J. F., L. Luoto, M. Casey and D. B. Lackman.** 1964. Serologic And Skin-Test Response After Q Fever Vaccination By The Intracutaneous Route. J Immunol. 93: 403-408.
19. **Berri, M., A. Souriau, M. Crosby, D. Crochet, P. Lechopier and A. Rodolakis.** 2001. Relationships between the shedding of *Coxiella burnetii*, clinical signs and serological responses of 34 sheep. Vet Rec. 148 (16): 502-505.
20. **Biberstein, E. L., H. P. Riemann, C. E. Franti, D. E. Behymer, R. Ruppanner, R. Bushnell and G. Crenshaw.** 1977. Vaccination of dairy cattle against Q fever (*Coxiella burnetii*): results of field trials. Am J Vet Res. 38 (2): 189-193.
21. **Brooks, D. L., R. W. Ermel, C. E. Franti, R. Ruppanner, D. E. Behymer, J. C. Williams and E. H. Stephenson.** 1986. Q fever vaccination of sheep: challenge of immunity in ewes. Am J Vet Res. 47 (6): 1235-1238.
22. **Burger, C.** 1996. Ein rekombinantes Protein von *Coxiella burnetii* als Kandidat für eine Vakzine: Untersuchungen zum Vorkommen des *omp*-Gens und zur Biosynthese, Reinigung und Antigenität des rekombinanten OMP-Proteins. Giessen: Dissertationsschrift vet. med.
23. **Burnette, W. N.** 1981. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. Anal Biochem. 112 (2): 195-203.
24. **Capo, C., F. P. Lindberg, S. Meconi, Y. Zaffran, G. Tardei, E. J. Brown, D. Raoult and J. L. Mege.** 1999. Subversion of monocyte functions by *Coxiella burnetii*: impairment of the cross-talk between α v β 3 integrin and CR3. J Immunol. 163 (11): 6078-6085.

25. **Capo, C., A. Moynault, Y. Collette, D. Olive, E. J. Brown, D. Raoult and J. L. Mege.** 2003. *Coxiella burnetii* Avoids Macrophage Phagocytosis by Interfering with Spatial Distribution of Complement Receptor 3. *J Immunol.* 170 (8): 4217-4225.
26. **Cianciotto, N. P., J. K. Stamos and D. W. Kamp.** 1995. Infectivity of *Legionella pneumophila* mip mutant for alveolar epithelial cells. *Curr Microbiol.* 30 (4): 247-250.
27. **Concha-Bermejillo, A., E. M. Kasari, K. E. Russell, L. E. Cron, E. J. Browder, R. Callicott, R. W. Ermel.** 2001. Q fever: an overview. United States Animal Health Association.
28. **Cox, J. C., A. R. Coulter.** 1997. Adjuvants-a classification and review of their modes of action. *Vaccine.* 15 (3): 248-256.
29. **Cromphout, K., L. Keldermans, A. Snellinx, J. F. Collet, S. Grunewald, N. De Geest, R. Sciote, E. Vanschaftingen, J. Jaeken, G. Matthijs and D. Hartmann.** 2005. Tissue distribution of the murine phosphomannomutases Pmm1 and Pmm2 during brain development. *Eur J Neurosci.* 22 (4): 991-996.
30. **Damrow, T. A., J. C. Williams and D. M. Waag.** 1985. Suppression of in vitro lymphocyte proliferation in C57BL/10 ScN mice vaccinated with phase I *Coxiella burnetii*. *Infect Immun.* 47 (1): 149-156.
31. **DeLisi, C. and J. A. Berzofsky.** 1985. T-cell antigenic sites tend to be amphipathic structures. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82 (20): 7048-7052.
32. **Dellacasagrande, J., C. Capo, D. Raoult and J. L. Mege.** 1999. IFN-gamma-mediated control of *Coxiella burnetii* survival in monocytes: the role of cell apoptosis and TNF. *J Immunol.* 162 (4): 2259-2265.
33. **Dixon, W. J.** 1993. BMDP Statistical Software Manual. Berkeley, Los Angeles, London: University of California Press.
34. **Donnelly, J. J., J. B. Ulmer and M. A. Liu.** 1997. DNA vaccines. *Life Sci.* 60 (3): 163-172.
35. **Döpfer, G., N. Schmeer, J. W. Frost, W. Lohrbach and G. Wachendorfer.** 1986. Tolerance and immunization trials with a commercial vaccine against *Chlamydia psittaci* and *Coxiella burnetii*. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 93 (6): 267-269.
36. **Farinha, M. A., S. L. Ronald, A. M. Kropinski and W. Paranchych.** 1993. Localization of the virulence-associated genes *pilA*, *pilR*, *rpoN*, *fliA*, *fliC*, *ent*, and *fbp* on the physical map of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 by pulsed-field electrophoresis. *Infect Immun.* 61 (4): 1571-1575.

37. **Fishbein, D. B. and D. Raoult.** 1992. A cluster of *Coxiella burnetii* infections associated with exposure to vaccinated goats and their unpasteurized dairy products. *Am J Trop Med Hyg.* 47 (1): 35-40.
38. **Fournier, P. E., T. J. Marrie and D. Raoult.** 1998. Diagnosis of Q fever. *J Clin Microbiol.* 36 (7): 1823-1834.
39. **Freylikhman, O., N. Tokarevich, A. Suvorov, E. Vorobiova and A. Totolian.** 2003. *Coxiella burnetii* persistence in three generations of mice after application of live attenuated human M-44 vaccine against Q fever. *Ann N Y Acad Sci.* 990: 496-499.
40. **Fries, L. F., D. M. Waag and J. C. Williams.** 1993. Safety and immunogenicity in human volunteers of a chloroform-methanol residue vaccine for Q fever. *Infect Immun.* 61 (4): 1251-1258.
41. **Fromme, B.** 1987. Zur Wirksamkeit von *Coxiella burnetii*-Vakzinen in der Maus anhand immunologischer, pathologischer und klinischer Parameter. Giessen: Dissertationsschrift vet. med.
42. **Gajdosova, E., E. Kovacova, R. Toman, L. Skultety, M. Lukacova and J. Kazar.** 1994. Immunogenicity of *Coxiella burnetii* whole cells and their outer membrane components. *Acta Virol.* 38 (6): 339-344.
43. **Genig, V. A.** 1960. Attenuated variant "M" of *Rickettsia burnetii* as a possible live vaccine against Q-fever. *Vestn Akad Med Nauk SSSR.* 15(2): 46-57.
44. **Gerischer, U.** 2002. Specific and global regulation of genes associated with the degradation of aromatic compounds in bacteria. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 4 (2): 111-121.
45. **Ghigo, E., C. Capo, D. Raoult and J. L. Mege.** 2001. Interleukin-10 stimulates *Coxiella burnetii* replication in human monocytes through tumor necrosis factor down-modulation: role in microbicidal defect of Q fever. *Infect Immun.* 69 (4): 2345-2352.
46. **Ghigo, E., C. Capo, C. H. Tung, D. Raoult, J. P. Gorvel and J. L. Mege.** 2002. *Coxiella burnetii* survival in THP-1 monocytes involves the impairment of phagosome maturation: IFN-gamma mediates its restoration and bacterial killing. *J Immunol.* 169 (8): 4488-4495.
47. **Ghigo, E., A. Honstettre, C. Capo, J. P. Gorvel, D. Raoult and J. L. Mege.** 2004. Link between impaired maturation of phagosomes and defective *Coxiella burnetii* killing in patients with chronic Q fever. *J Infect Dis.* 190 (10): 1767-1772.
48. **Hackstadt, T. and J. C. Williams.** 1981. Biochemical stratagem for obligate parasitism of eukaryotic cells by *Coxiella burnetii*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 78 (5): 3240-3244.

49. **Hackstadt, T. and J. C. Williams.** 1983. pH dependence of the *Coxiella burnetii* glutamate transport system. J Bacteriol. 154 (2): 598-603.
50. **Harris, R. J., P. A. Storm, A. Lloyd, M. Arens and B. P. Marmion.** 2000. Long-term persistence of *Coxiella burnetii* in the host after primary Q fever. Epidemiol Infect. 124 (3): 543-549.
51. **Heinzen, R. A., M. A. Scidmore, D. D. Rockey and T. Hackstadt.** 1996. Differential interaction with endocytic and exocytic pathways distinguish parasitophorous vacuoles of *Coxiella burnetii* and *Chlamydia trachomatis*. Infect Immun. 64 (3): 796-809.
52. **Hellenbrand, W., T. Breuer and L. Petersen.** 2001. Changing epidemiology of Q fever in Germany, 1947-1999. Emerg Infect Dis. 7 (5): 789-796.
53. **Hendrix, L. and L. P. Mallavia.** 1984. Active transport of proline by *Coxiella burnetii*. J Gen Microbiol. 130 (11): 2857-2863.
54. **Hendrix, L. R., J. E. Samuel and L. P. Mallavia.** 1990. Identification and cloning of a 27-kDa *Coxiella burnetii* immunoreactive protein. Ann N Y Acad Sci. 590: 534-540.
55. **Hendrix, L. R., L. P. Mallavia and J. E. Samuel.** 1993. Cloning and sequencing of *Coxiella burnetii* outer membrane protein gene *com1*. Infect Immun. 61 (2): 470-477.
56. **Honstettre, A., G. Imbert, E. Ghigo, F. Gouriet, C. Capo, D. Raoult and J. L. Mege.** 2003. Dysregulation of cytokines in acute Q Fever: role of interleukin-10 and tumor necrosis factor in chronic evolution of Q Fever. J Infect Dis. 187 (6): 956-962.
57. **Honstettre, A., E. Ghigo, A. Moynault, C. Capo, R. Toman, S. Akira, O. Takeuchi, H. Lepidi, D. Raoult and J. L. Mege.** 2004. Lipopolysaccharide from *Coxiella burnetii* is involved in bacterial phagocytosis, filamentous actin reorganization, and inflammatory responses through Toll-like receptor 4. J Immunol. 172 (6): 3695-3703.
58. **Hoover, T. A., D. W. Culp, M. H. Vodkin, J. C. Williams and H. A. Thompson.** 2002. Chromosomal DNA deletions explain phenotypic characteristics of two antigenic variants, phase II and RSA 514 (crazy), of the *Coxiella burnetii* nine mile strain. Infect Immun. 70 (12): 6726-6733.
59. **Hopp, T. P.** 1986. Protein surface analysis. Methods for identifying antigenic determinants and other interaction sites. J Immunol Methods. 88 (1): 1-18.
60. **Howe, D. and L. P. Mallavia.** 2000. *Coxiella burnetii* exhibits morphological change and delays phagolysosomal fusion after internalization by J774A.1 cells. Infect Immun. 68 (7): 3815-3821.

61. **Howe, D., J. Melnicakova, I. Barak and R. A. Heinzen.** 2003. Maturation of the *Coxiella burnetii* parasitophorous vacuole requires bacterial protein synthesis but not replication. *Cell Microbiol.* 5 (7): 469-480.
62. **Huygen, K.** 2003. On the use of DNA vaccines for the prophylaxis of mycobacterial diseases. *Infect Immun.* 71 (4): 1613-1621.
63. **Igietseme, J. U.** 2003. Antibody regulation of T-cell immunity: implications for vaccine strategies against intracellular pathogens. *Expert Rev. Vaccines.* 3: 23-34.
64. **Izzo, A. A., B. P. Marmion and D. A. Worswick.** 1988. Markers of cell-mediated immunity after vaccination with an inactivated, whole-cell Q fever vaccine. *J Infect Dis.* 157 (4): 781-789.
65. **Izzo, A. A., B. P. Marmion and T. Hackstadt.** 1991. Analysis of the cells involved in the lymphoproliferative response to *Coxiella burnetii* antigens. *Clin Exp Immunol.* 85 (1): 98-108.
66. **Izzo, A. A. and B. P. Marmion.** 1993. Variation in interferon-gamma responses to *Coxiella burnetii* antigens with lymphocytes from vaccinated or naturally infected subjects. *Clin Exp Immunol.* 94 (3): 507-515.
67. **Jerrells, T. R., L. P. Mallavia and D. J. Hinrichs.** 1975. Detection of long-term cellular immunity to *Coxiella burnetii* as assayed by lymphocyte transformation. *Infect Immun.* 11 (2): 280-286.
68. **Johnson, J. W., G. A. Eddy and C. E. Pedersen, Jr.** 1976. Biological properties of the M-44 strain of *Coxiella burnetii*. *J Infect Dis.* 133 (3): 334-338.
69. **Johnson, J. W., C. G. McLeod, J. L. Stookey, G. A. Higbee and C. E. Pedersen, Jr.** 1977. Lesions in guinea pigs infected with *Coxiella burnetii* strain M-44. *J Infect Dis.* 135 (6): 995-998.
70. **Kagawa, F. T., J. H. Wehner and V. Mohindra.** 2003. Q fever as a biological weapon. *Semin Respir Infect.* 18 (3): 183-195.
71. **Kato, K., Y. Arashima, S. Asai, Y. Furuya, Y. Yoshida, M. Murakami, Y. Takahashi, K. Hayashi, T. Katayama, K. Kumasaka, Y. Arakawa and K. Kawano.** 1998. Detection of *Coxiella burnetii* specific DNA in blood samples from Japanese patients with chronic nonspecific symptoms by nested polymerase chain reaction. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 21 (2): 139-144.

72. Kaufmann, S. H. E. 1993. Immunity to intracellular bacteria. W. E. Paul, New York, U. S. A.: Raven Press.
73. Kaufmann, S. H. E. 1995. Immunity to intracellular microbial pathogens. *Immunol Today*. 16 (7): 338-342.
74. Kazar, J., R. Brezina, A. Palanova, B. Tvrda and S. Schramek. 1982. Immunogenicity and reactogenicity of a Q fever chemovaccine in persons professionally exposed to Q fever in Czechoslovakia. *Bull World Health Organ*. 60 (3): 389-394.
75. Kazar, J. and E. Kovacova. 1983/a. Failure of Q fever phase I corpuscular vaccine to influence the persistence and reactivation of *Coxiella burnetii* infection in mouse and guinea pig tissues. *Acta Virol*. 27 (5): 418-428.
76. Kazar, J., S. Schramek and S. Zajacova. 1983/b. Induction of splenomegaly in mice by killed *Coxiella burnetii* cells. *Acta Virol*. 27 (1): 65-70.
77. Kazar, J., D. Votruba, P. Propper and S. Schramek. 1986. Onset and duration of immunity in guinea pigs and mice induced with different Q fever vaccines. *Acta Virol*. 30 (6): 499-506.
78. Kazar, J. and J. Rehacek. 1987. Q fever vaccines: present status and application in man. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A]*. 267 (1): 74-78.
79. Kazar, J. 1988. Immunity in Q fever. *Acta Virol*. 32 (4): 358-368.
80. Kloppert, B., W. Wolter, M. Zschock, D. Kabisch, H. P. Hamann and J. W. Frost. 2004. *Coxiella burnetii* as zoonotic pathogen with special regard to food hygiene. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*. 111 (8): 321-323.
81. Krauss, H. 1982. The importance of *Rickettsiae* and *Chlamydia* in small domestic animals as pathogens of zoonoses. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*. 95 (24): 480-483.
82. La Scola, B. and D. Raoult. 2001. Survival of *Coxiella burnetii* within free-living amoeba *Acanthamoeba castellanii*. *Clin Microbiol Infect*. 7 (2): 75-79.
83. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227 (5259): 680-685.
84. Lang, G. H. 1990. Coxiellosis (Q fever) in animals. T. J. Marrie, Boca Raton, U.S.A.: CRC Press.

85. **Langel, J.** 1987. Untersuchungen zur Erstellung eines *in vivo*-Modells für die Überprüfung von Q-Fieber-Vakzinen anhand verschiedener Parameter, sowie Charakterisierung der humoralen Immunantwort bei experimenteller *Coxiella burnetii*-Infektion der Maus. Giessen: Dissertationsschrift vet. med.
86. **Li, Q., D. Niu, B. Wen, M. Chen, L. Qiu and J. Zhang.** 2005. Protective immunity against Q fever induced with a recombinant P1 antigen fused with HspB of *Coxiella burnetii*. Ann N Y Acad Sci. 1063: 130-142.
87. **Liebisch, A., W. Burgdorfer and M. S. Rahman.** 1978. Epidemiologic study on sheep ticks (*Dermacentor marginatus*) of rickettsial infections. Dtsch Tierarztl Wochenschr. 85 (4): 121-126.
88. **MacGregor, C. H., S. K. Arora, P. W. Hager, M. B. Dail and P. V. Phibbs, Jr.** 1996. The nucleotide sequence of the *Pseudomonas aeruginosa* *pyrE-crc-rph* region and the purification of the *crc* gene product. J Bacteriol. 178 (19): 5627-5635.
89. **Madariaga, M. G., K. Rezai, G. M. Trenholme and R. A. Weinstein.** 2003. Q fever: a biological weapon in your backyard. Lancet Infect Dis. 3 (11): 709-721.
90. **Marmion, B. P., R. A. Ormsbee, M. Kyrkou, J. Wright, D. Worswick, S. Cameron, A. Esterman, B. Feery and W. Collins.** 1984. Vaccine prophylaxis of abattoir-associated Q fever. Lancet. 2 (8417-18): 1411-1414.
91. **Marrie, T. J.** 1989. Q fever pneumonia. Semin Respir Infect. 4 (1): 47-55.
92. **Marrie, T. J.** 1990. Epidemiology in Q fever. T. J. Marrie, Boca Raton, U.S.A.: CRC Press.
93. **Maubec, E., L. Pinquier, M. Viguier, F. Caux, E. Amsler, S. Aractingi, H. Chafi, A. Janin, J. M. Cayuela, L. Dubertret, F. J. Authier and H. Bachelez.** 2005. Vaccination-induced cutaneous pseudolymphoma. J Am Acad Dermatol. 52 (4): 623-629.
94. **Maurin, M. and D. Raoult.** 1999. Q fever. Clin Microbiol Rev. 12 (4): 518-553.
95. **Mege, J.-L., M. Maurin, C. Capo, D. Raoult.** 1997. *Coxiella burnetii*: the 'query' fever bacterium A model of immune subversion by a strictly intracellular microorganism. FEMS Microbiology Reviews. 209-217.
96. **Milazzo, A., R. Hall, P. A. Storm, R. J. Harris, W. Winslow and B. P. Marmion.** 2001. Sexually transmitted Q fever. Clin Infect Dis. 33 (3): 399-402.

97. **Mo, Y. Y., N. P. Cianciotto and L. P. Mallavia.** 1995. Molecular cloning of a *Coxiella burnetii* gene encoding a macrophage infectivity potentiator (Mip) analogue. *Microbiology*. 141 (Pt 11): 2861-2871.
98. **Moos, A. and T. Hackstadt.** 1987. Comparative virulence of intra- and interstrain lipopolysaccharide variants of *Coxiella burnetii* in the guinea pig model. *Infect Immun*. 55 (5): 1144-1150.
99. **Mossienko, E. V., N. K. Tokarevich, A. N. Suvorov and A. A. Totolian.** 2003. Detection of *Coxiella burnetii* by PCR in mice after administration of live M-44 vaccine. *Folia Microbiol (Praha)*. 48 (1): 103-104.
100. **Müller, H. P., N. Schmeer, L. Rantamaki, B. Semler and H. Krauss.** 1987. Isolation of a protein antigen from *Coxiella burnetii*. *Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg [A]*. 265 (3-4): 277-289.
101. **NCBI**
102. **Norlander, L.** 2000. Q fever epidemiology and pathogenesis. *Microbes and infection*. 2: 417-424.
103. **Ormsbee, R. A. M., Bell, E. J., Lackmann, D. P., and Tallent, G.** 1964. The influence of phase on the protective potency of Q fever vaccine. *J. Immunol*. 92: 404-412.
104. **Ormsbee, R., M. Peacock, R. Gerloff, G. Tallent and D. Wike.** 1978. Limits of rickettsial infectivity. *Infect Immun*. 19 (1): 239-245.
105. **Ormsbee, R. A. M.** 1990. Prevention of *Coxiella burnetii* infection: Vaccines and guidelines for those at risk. T. J. Marrie, Boca Raton, U. S. A.: CRC Press.
106. **Palmer, N. C., M. Kierstead, D. W. Key, J. C. Williams and H. Vellend.** 1983. Placentitis and abortion in goats and sheep in Ontario caused by *Coxiella burnetii*. *Canadian Veterinary Journal*. 24: 60-61.
107. **Peacock, M. G., P. Fiset, R. A. Ormsbee, C. L. Jr. Wisseman** 1979. Antibody response in man following a small intradermal inoculation with *Coxiella burnetii* phase I vaccine. *Acta Virol*. 23: 73-81.
108. **Peacock, M. G., R. N. Philip, J. C. Williams and R. S. Faulkner.** 1983. Serological evaluation of Q fever in humans: enhanced phase I titers of immunoglobulins G and A are diagnostic for Q fever endocarditis. *Infect Immun*. 41 (3): 1089-1098.
109. **Peters, A. R.** 1995. Vaccines for Veterinary Applications. Oxford: Butterworth-Heinemann Ltd.

110. **Raoult, D.** 1990. Host factors in the severity of Q fever. *Ann N Y Acad Sci.* 590: 33-38.
111. **Raoult, D.** 1993. Treatment of Q fever. *Antimicrob Agents Chemother.* 37 (9): 1733-1736.
112. **Raoult, D., H. Tissot-Dupont, C. Foucault, J. Gouvernet, P. E. Fournier, E. Bernit, A. Stein, M. Nesri, J. R. Harle and P. J. Weiller.** 2000. Q fever 1985-1998. Clinical and epidemiologic features of 1,383 infections. *Medicine (Baltimore).* 79 (2): 109-123.
113. **Regni, C., P. A. Tipton and L. J. Beamer.** 2002. Crystal structure of PMM/PGM: an enzyme in the biosynthetic pathway of *P. aeruginosa* virulence factors. *Structure (Camb).* 10 (2): 269-279.
114. **Reimer, L. G.** 1993. Q fever. *Clin Microbiol Rev.* 6 (3): 193-198.
115. **Rennels, M. B., M. A. Deloria, M. E. Pichichero, G. A. Losonsky, J. A. Englund, B. D. Meade, E. L. Anderson, M. C. Steinhoff and K. M. Edwards.** 2000. Extensive swelling after booster doses of acellular pertussis-tetanus-diphtheria vaccines. *Pediatrics.* 105 (1): e12.
116. **Roitt, I. M.** 1993. Leitfaden der Immunologie. Berlin: 4. Aufl. Blackwell Wissenschaft.
117. **Sachs, L.** 1992. Angewandte Statistik. Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo: Springer-Verlag.
118. **Salmon, M. M., B. Howells, E. J. Glencross, A. D. Evans and S. R. Palmer.** 1982. Q fever in an urban area. *Lancet.* 1 (8279): 1002-1004.
119. **Schmadel, J. E., M. J. Snyder , F. C. Robbins.** 1948. Vaccination against Q fever. *Am. J. Hyg.* 47: 71.
120. **Schmeer, N., H. Krauss, D. Werth and H. G. Schiefer.** 1987. Serodiagnosis of Q fever by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A].* 267 (1): 57-63.
121. **Schmeer, N., P. Muller, J. Langel, H. Krauss, J. W. Frost and J. Wieda.** 1987. Q fever vaccines for animals. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A].* 267 (1): 79-88.
122. **Scott, G. H., J. C. Williams and E. H. Stephenson.** 1987. Animal models in Q fever: pathological responses of inbred mice to phase I *Coxiella burnetii*. *J Gen Microbiol.* 133 (Pt 3): 691-700.
123. **Scott, G. H., T. F. McCaul and J. C. Williams.** 1989. Inactivation of *Coxiella burnetii* by gamma irradiation. *J Gen Microbiol.* 135 (12): 3263-3270.

124. **Seshadri, R., I. T. Paulsen, J. A. Eisen, T. D. Read, K. E. Nelson, W. C. Nelson, N. L. Ward, H. Tettelin, T. M. Davidsen, M. J. Beanan, R. T. Deboy, S. C. Daugherty, L. M. Brinkac, R. Madupu, R. J. Dodson, H. M. Khouiri, K. H. Lee, H. A. Carty, D. Scanlan, R. A. Heinzen, H. A. Thompson, J. E. Samuel, C. M. Fraser and J. F. Heidelberg.** 2003. Complete genome sequence of the Q-fever pathogen *Coxiella burnetii*. Proc Natl Acad Sci U S A. 100 (9): 5455-5460.
125. **Silvaggi, N. R., C. Zhang, Z. Lu, J. Dai, D. Dunaway-Mariano and K. N. Allen.** 2006. The X-ray crystal structures of human alpha-phosphomannomutase 1 reveal the structural basis of congenital disorder of glycosylation type 1a. J Biol Chem. 281 (21): 14918-14926.
126. **Sokol, P. A. and D. E. Woods.** 1986. Characterization of antibody to the ferripyochelin-binding protein of *Pseudomonas aeruginosa*. Infect Immun. 51 (3): 896-900.
127. **Souriau, A., N. Arricau-Bouvery, C. Bodier and A. Rodolakis.** 2003. Comparison of the efficacy of Q fever vaccines against *Coxiella burnetii* experimental challenge in pregnant goats. Ann N Y Acad Sci. 990: 521-523.
128. **Spearman, C. u. G. K., zit. nach Mayr et al..** 1974. Virologische Arbeitsmethoden, Bd. 1. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.
129. **Studier, F. W. and B. A. Moffatt.** 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. J Mol Biol. 189 (1): 113-130.
130. **Studier, F. W., A. H. Rosenberg, J. J. Dunn and J. W. Dubendorff.** 1990. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. Methods Enzymol. 185: 60-89.
131. **Thiele, D., H. Krauss.** 1989. Vaccines and their role in prevention and control of Q fever in domestic animals.
132. **Thiele, D.** 1996. *Coxiella burnetii*: Untersuchungen zur genetischen Heterogenität sowie Komplettssequenzierung und Analyse des QpH1-Plasmids. Gießen: Habil. Schrift.
133. **Thompson, H. A., T. A. Hoover, M. H. Vodkin, and E. I. Shaw.** 2003. Do chromosomal deletions in the lipopolysaccharide biosynthetic regions explain all cases of phase variation in *Coxiella burnetii* strains? Ann N Y Acad Sci. 990: 664-670.
134. **Thoms, H.-J.** 1996. Epidemiologische Untersuchung zum Vorkommen von *Coxiella burnetii* auf vier Truppenübungsplätzen der Bundeswehr in Nordrhein-Westfalen und Niedersachsen. Gießen: Dissertationsschrift vet. med.

135. **Tissot-Dupont, H., D. Raoult, P. Brouqui, F. Janbon, D. Peyramond, P. J. Weiller, C. Chicheportiche, M. Nezri and R. Poirier.** 1992. Epidemiologic features and clinical presentation of acute Q fever in hospitalized patients: 323 French cases. *Am J Med.* 93 (4): 427-434.
136. **Tissot-Dupont, H., M. A. Amadei, M. Nezri and D. Raoult.** 2004. Wind in November, Q fever in December. *Emerg Infect Dis.* 10 (7): 1264-1269.
137. **To, H., K. K. Htwe, N. Kako, H. J. Kim, T. Yamaguchi, H. Fukushi and K. Hirai.** 1998. Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in dairy cattle with reproductive disorders. *J Vet Med Sci.* 60 (7): 859-861.
138. **Tokarevich, N. K., A. B. Daiter, Y. E. Polotsky, M. Lukacova, J. Kazar, N. A. Kartseva, V. A. Kuzina, V. E. Efremov and A. G. Belov.** 1993. Biological properties of chloroform/methanol extracts of *Coxiella burnetii*. *Acta Virol.* 37 (1): 29-40.
139. **Toman, R., P. Garidel, J. Andra, K. Slaba, A. Hussein, M. H. Koch and K. Brandenburg.** 2004. Physicochemical characterization of the endotoxins from *Coxiella burnetii* strain Priscilla in relation to their bioactivities. *BMC Biochem.* 5: 1.
140. **Varghees, S., K. Kiss, G. Frans, O. Braha and J. E. Samuel.** 2002. Cloning and porin activity of the major outer membrane protein P1 from *Coxiella burnetii*. *Infect Immun.* 70 (12): 6741-6750.
141. **Vodkin, M. H., J. C. Williams and E. H. Stephenson.** 1986. Genetic heterogeneity among isolates of *Coxiella burnetii*. *J Gen Microbiol.* 132 (Pt 2): 455-463.
142. **Vodkin, M. H. and J. C. Williams.** 1988. A heat shock operon in *Coxiella burnetii* produces a major antigen homologous to a protein in both mycobacteria and *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 170 (3): 1227-1234.
143. **Waag, D. M., M. J. England and M. L. Pitt.** 1997. Comparative efficacy of a *Coxiella burnetii* chloroform:methanol residue (CMR) vaccine and a licensed cellular vaccine (Q-Vax) in rodents challenged by aerosol. *Vaccine.* 15 (16): 1779-1783.
144. **Waag, D. M., M. J. England, R. F. Tammariello, W. R. Byrne, P. Gibbs, C. M. Banfield and M. L. Pitt.** 2002. Comparative efficacy and immunogenicity of Q fever chloroform:methanol residue (CMR) and phase I cellular (Q-Vax) vaccines in cynomolgus monkeys challenged by aerosol. *Vaccine.* 20 (19-20): 2623-2634.

145. **Werling, D. and T. W. Jungi.** 2003. TOLL-like receptors linking innate and adaptive immune response. *Vet Immunol Immunopathol.* 91 (1): 1-12.
146. **Wieland, H., M. Faigle, F. Lang, H. Northoff and B. Neumeister.** 2002. Regulation of the *Legionella* mip-promotor during infection of human monocytes. *FEMS Microbiol Lett.* 212 (1): 127-132.
147. **Williams, J. C. and J. L. Cantrell.** 1982. Biological and immunological properties of *Coxiella burnetii* vaccines in C57BL/10ScN endotoxin-nonresponder mice. *Infect Immun.* 35 (3): 1091-1102.
148. **Williams, J. C., V. Sanchez, G. H. Scott, E. H. Stephenson and P. H. Gibbs.** 1985. Variation in responsiveness of BALB/c sublines and congenic mice to phase I *Coxiella burnetii* infection and vaccination. *Curr Top Microbiol Immunol.* 122: 189-199.
149. **Williams, J. C., T. A. Damrow, D. M. Waag and K. Amano.** 1986. Characterization of a phase I *Coxiella burnetii* chloroform-methanol residue vaccine that induces active immunity against Q fever in C57BL/10 ScN mice. *Infect Immun.* 51 (3): 851-858.
150. **Williams, J. C., T. A. Hoover, D. M. Waag, N. Banerjee-Bhatnagar, C. R. Bolt and G. H. Scott.** 1990. Antigenic structure of *Coxiella burnetii*. A comparison of lipopolysaccharide and protein antigens as vaccines against Q fever. *Ann N Y Acad Sci.* 590: 370-380.
151. **Williams, J. C., D. M. Waag.** 1991. Antigens, virulence factors and biological response modifiers of *Coxiella burnetii*: strategies for vaccine development J. C. T. Williams, H. A., Boca Raton, U S. A.: CRC Press.
152. **Williams, J. C., M. G. Peacock, D. M. Waag, G. Kent, M. J. England, G. Nelson and E. H. Stephenson.** 1992. Vaccines against coxiellosis and Q fever. Development of a chloroform:methanol residue subunit of phase I *Coxiella burnetii* for the immunization of animals. *Ann N Y Acad Sci.* 653: 88-111.
153. **Young, D. B.** 1990. Chaperonins and the immune response. *Semin Cell Biol.* 1 (1): 27-35.
154. **Zamboni, D. S., M. A. Campos, A. C. Torrecilhas, K. Kiss, J. E. Samuel, D. T. Golenbock, F. N. Lauw, C. R. Roy, I. C. Almeida and R. T. Gazzinelli.** 2004. Stimulation of toll-like receptor 2 by *Coxiella burnetii* is required for macrophage production of pro-inflammatory cytokines and resistance to infection. *J Biol Chem.* 279 (52): 54405-54415.
155. **Zeman, D. H., C. A. Kirkbride, P. Leslie-Steen and J. R. Duimstra.** 1989. Ovine abortion due to *Coxiella burnetii* infection. *J Vet Diagn Invest.* 1 (2): 178-180.

156. **Zhang, G. Q. and J. E. Samuel.** 2003. Identification and cloning potentially protective antigens of *Coxiella burnetii* using sera from mice experimentally infected with Nine Mile phase I. Ann N Y Acad Sci. 990: 510-520.
157. **Zhang, G. Q, K. Kiss, R. Seshadri, L. R. Hendrix and J. E. Samuel.** 2004/a. Identification and cloning of immunodominant antigens of *Coxiella burnetii*. Infect Immun. 72 (2): 844-852.
158. **Zhang, G. Q and J. E. Samuel.** 2004/b. Vaccines against *Coxiella* infection. Expert Rev Vaccines. 3 (5): 577-584.
159. **Zhang, Y. X., N. Zhi, S. R. Yu, Q. J. Li, G. Q. Yu and X. Zhang.** 1994. Protective immunity induced by 67 K outer membrane protein of phase I *Coxiella burnetii* in mice and guinea pigs. Acta Virol. 38 (6): 327-332.
160. **Zielinski, N. A., A. M. Chakrabarty and A. Berry.** 1991. Characterization and regulation of the *Pseudomonas aeruginosa algC* gene encoding phosphomannomutase. J Biol Chem. 266 (15): 9754-9763.
161. **Zuber, M., T. A. Hoover and D. L. Court.** 1995. Analysis of a *Coxiella burnetii* gene product that activates capsule synthesis in *Escherichia coli*: requirement for the heat shock chaperone DnaK and the two-component regulator RcsC. J Bacteriol. 177 (15): 4238-4244.

ANHANG

Nährmedien zur Anzucht von Bakterien

LB- (Luria-Bertani-) Medium: 5 g NaCl, 5 g Hefeextrakt, 10 g Bacto[®] Trypton, 4 ml NaOH, mit *Aqua deion.* ad 1 l auffüllen

Das Medium wurde nach der Herstellung autoklaviert und dunkel bei 4 °C gelagert. Für einige Anzucht- und Induktionsversuche wurde frisch hergestelltes, nicht autoklaviertes Medium eingesetzt.

LB-Agarplatten:

Zur Herstellung von LB-Agarplatten wurde 1 l des entsprechenden Mediums mit 15 g Agar Agar versetzt und anschließend autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf 50 °C konnten antimikrobielle Wirkstoffe zugegeben und die Platten gegossen werden.

Zellkulturmedium MEM:

Minimal Essential Medium mit Earle' Salzen; supplementiert mit:

- MEM Vitaminkonzentrat
- 2 mmol/l L-Glutamin
- 5 % fötales Kälberserum (FKS,
frei von *α-C. burnetii*-Anti-
körpern)

Antimikrobielle Wirkstoffe

Ampicillin-Lösung: 50 mg Ampicillin-Natriumsalz *ad* 1 ml *Aqua deion.*;
sterilfiltrieren, bei -20 °C lagern

Die Selektion erfolgte mit einer Endkonzentration von 50 µg/ml.

Kanamycin-Lösung: 30 mg Kanamycin *ad* 1 ml *Aqua deion.*;
sterilfiltrieren, bei -20 °C lagern

Eine Endkonzentration von 30 µg/ml wurde zur Selektion genutzt.

Protein-Standards

Prestained Protein Marker (Fa. New England Biolabs):

Proteine mit Molekulargewichten von 6,5, 16,5, 25, 32,5, 47,5, 62, 83 und 175 kDa

Puffer und Lösungen

Sofern nicht anders angegeben erfolgte die Lagerung der nachfolgend aufgeführten Puffer bzw. Lösungen bei RT.

Puffer zur Affinitätschromatographischen Aufreinigung

<u>Lysispuffer:</u>	100 mM NaH ₂ PO ₄ , 10 mM Tris-HCl, 6 M GuHCl; auf pH 8,0 einstellen
<u>Waschpuffer:</u>	100 mM NaH ₂ PO ₄ , 10 mM Tris-HCl, 6 M GuHCl; auf pH 6,3 einstellen
<u>Elutionspuffer 1:</u>	100 mM NaH ₂ PO ₄ , 10 mM Tris-HCl, 6 M GuHCl; auf pH 5,9 einstellen
<u>Elutionspuffer 2:</u>	100 mM NaH ₂ PO ₄ , 10 mM Tris-HCl, 6 M GuHCl; auf pH 4,5 einstellen

Puffer zur Durchführung der SDS-PAGE

<u>Trenngelpuffer:</u>	1,5 M Tris-HCl; auf pH 8,8 einstellen
<u>Sammelgelpuffer:</u>	1 M Tris-HCl; auf pH 6,8 einstellen
<u>SDS-Laufpuffer (10 x):</u>	0,25 M Tris, 0,52 M Glycin, 10,0 g SDS
<u>2 x Probenpuffer:</u>	2 ml Glycerin, 1 ml 10%-iges SDS, 200 µl β-Mercaptoethanol, 290 µl 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8), 6,91 ml Aqua deion., 150 µl Bromphenolblau (2 mg/ml in 0,1 M Tris-HCl, pH 7,5)

Bis zur weiteren Verwendung wurde der Probenpuffer bei -20 °C aufbewahrt.

Puffer zur Durchführung von Western-Blots bzw. Immunoblots

<u>Anodenpuffer I:</u>	300 ml 1 M Tris-HCl, 200 ml Methanol, 500 ml Aqua deion.
<u>Anodenpuffer II:</u>	25 ml 1 M Tris-HCl, 200 ml Methanol, 770 ml Aqua deion.
<u>Kathodenpuffer:</u>	25 ml 1 M Tris-HCl, 5,25 g 6-Aminocapronsäure, 200 ml Methanol, 770 ml Aqua deion.
<u>Blockingpuffer:</u>	BSA 1 %-ig in PBS-Tween Die Lagerung des Blockingpuffers erfolgte bei -20 °C.
<u>Substratlösung:</u>	8 ml 1 x PBS, 3 ml Chloronaphtol, 5 µl Wasserstoffperoxid (konzentriert) Die Substratlösung wurde vor jeder Anwendung frisch hergestellt.

Phosphatpuffer

PBS (10 x): 100 g NaCl, 2,5 g KCl, 2,5 g KH_2PO_4 , 18 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, mit *Aqua deion.* ad 1000 ml auffüllen

PBS-Tween: 1 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0,94 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 16,36 g NaCl, 1 ml Tween[®] 20 (pH 7,2), mit *Aqua deion.* ad 2000 ml

Na-Phosphatpuffer (0,1 M): 3,5 ml 0,2 M NaH_2PO_4 , 15,5 ml 0,2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ und 19 ml *Aqua deion.*

Coating-Puffer

Coating-Puffer: 1,2 g Tris, 5,8 g NaCl, 0,2 g NaN_3 , 40 µl Complete Protease Inhibitor, *Aqua deion.* ad 1000 ml; auf pH 8,5 eingestellt

Die Aufbewahrung des Coating-Puffers erfolgte bei 4 °C.

*Färbe- und Entfärbelösungen*Coomassie Brilliant Blau-Färbelösung:

500 ml *Aqua deion.*, 400 ml Methanol, 100 ml Eisessig, 800 mg Coomassie Brilliant Blue R 250; ca. 30 min bei Raumtemperatur rühren lassen, ggf. filtrieren.

Die Coomassie Brilliant Blau-Färbelösung kann mehrfach verwendet werden.

Blitzentfärber (konzentriert):

450 ml *Aqua deion.*, 450 ml Methanol, 100 ml Eisessig

Entfärber (verdünnt):

880 ml *Aqua deion.*, 50 ml Methanol, 70 ml Eisessig

Das Entfärben der SDS-PAGES erfolgt unter optischer Kontrolle.

Auftragspuffer für DNA-Proben:

0,025 g Bromphenolblau Na-Salz, 0,025 g Xylene cyanol FF, 3 g Glycerin, mit *Aqua deion.* ad 10 ml auffüllen

Karbolfuchsin-Stammlösung:

100 ml 10 % (w/v) Neofuchsin, 250 ml 4 % (v/v) Phenol und 650 ml *Aqua deion.*

Die gemischte Färbelösung vor Gebrauch für 48 h bei 4 °C stehenlassen.

Karbolfuchsin-Gebrauchslösung:

6 ml Karbolfuchsin-Stammlösung und 10 ml Na-Phosphatpuffer

Die Gebrauchslösung vor Verwendung frisch herstellen und filtrieren.

Malachitgrün-Färbelösung (0,8 %):

8 g Malachitgrün in 1 l *Aqua deion.* lösen

Die Färbelösung vor Gebrauch filtrieren und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C lagern.

Zusammensetzung der Polyacrylamidgele:

Trenngel (12,5 %): 2,5 ml Trenngelpuffer, 5 ml Acryl-Bisacrylamid (30:1,5), 62,5 µl 20 %-iges SDS, 3,75 ml 8 M Harnstoff, 890 µl *Aqua deion.*, 10 µl TEMED, 60 µl 10 %-iges Ammonium-Persulfat

Sammelgel (4,5 %): 250 µl Sammelgelpuffer, 250 µl Acryl-Bisacrylamid (50:0,8), 12,5 µl 20 %-iges SDS, 1,5 ml 8 M Harnstoff, 450 µl *Aqua deion.*, 2,5 µl TEMED, 75 µl 10 %-iges Ammonium-Persulfat

Chemikalien und Enzyme:ReagenzFirma, Firmensitz

Acrylamid

Fa. Roth, Karlsruhe

Agarose D-1 LE

Fa. Hispanlab, S.A., Madrid, Spanien

Agar Agar

Fa. Merck, Darmstadt

Ammonium Persulfat

Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
Steinheim

Ampicillin-Natriumsalz

Fa. Roth, Karlsruhe

Bacto[®] Trypton

Fa. Difco, Hamburg

Bisacrylamid

Fa. Roth, Karlsruhe

Bromphenolblau Na-Salz

Fa. Serva, Heidelberg

Bovines Serumalbumin (BSA)

Fa. Roth, Karlsruhe

Complete Protease Inhibitor

Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Coomassie Brilliant Blue R 250

Fa. Serva, Heidelberg

Chloronaphtol

Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
Steinheim

Dodecylsulfat Natriumsalz (SDS)

Fa. Merck, Darmstadt

Eisessig

Fa. Roth, Karlsruhe

Ethanol (Vol. 99%)

Fa. Merck, Darmstadt

Ethanol (Vol. 94%)

Fa. Berkel AHK Verbraucherprodukte
GmbH & Co. KG, Lippstadt

<u>Reagenz</u>	<u>Firma, Firmensitz</u>
Ethidiumbromid	Fa. Serva, Heidelberg
Fötales Kälberserum	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Guanidiniumhydrochlorid	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Hefeextrakt	Fa. Merck, Darmstadt
Isopropanol	Fa. Merck, Darmstadt
Isopropyl- β -D-thiogalaktosid (IPTG)	Fa. Roth, Karlsruhe
L-Glutamin	Fa. Serva, Heidelberg
Kanamycin	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
KH_2PO_4	Fa. Merck, Darmstadt
Malachitgrün	Fa. Merck, Darmstadt
MEM mit Earle's Salzen und 2 mmol/l L-Glutamin	Fa. Biochrom KG, Berlin
MEM-Vitaminkonzentrat	Fa. Biochrom KG, Berlin
β -Mercaptoethanol	Fa. Serva, Heidelberg
Methanol	Fa. VWR, Darmstadt, Fa. Merck, Darmstadt
NaCl	Fa. Merck, Darmstadt
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	Fa. Merck, Darmstadt
NaH_2PO_4	Fa. Merck, Darmstadt
NaOH	Fa. Riedel-de Häen, Seelze
Neofuchsin	Fa. Merck, Darmstadt
Phenol	Fa. Roth GmbH, Karlsruhe
Tetramethylethylendiamin	Fa. Serva, Heidelberg
Trisacetat	Fa. Merck, Darmstadt
Tris-HCl	Fa. Roth, Karlsruhe
Tween [®] 20	Fa. Merck, Darmstadt
Xylene cyanol FF	Fa. Serva, Heidelberg

Vorgefertigte Reagenzien:ReagenzFirma, FirmensitzAlu-Gel-S [Al(OH)₃]

Fa. Serva, Heidelberg

 α -Maus-Ig-Peroxidase-KonjugatFa. Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH,
Freiburg

BAY R1005

Fa. Bayer, Leverkusen

BCA*Protein Assay Reagent

Fa. Pierce, Illinois, USA

Blocking Reagent for ELISA

Fa. Boehringer, Ingelheim

DNeasy[®] Tissue Kit

Fa. Qiagen, Hilden

GFX[™] Micro Plasmid Prep KitFa. Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH,
FreiburgNi²⁺-NTA Agarose

Fa. Qiagen, Hilden

Ni²⁺-NTA-HRP-Konjugat

Fa. Qiagen, Hilden

Anästhetika:BezeichnungFirma, FirmensitzKetavet[®] (10 %)

Fa. Pharmacia GmbH, Erlangen

Rompun[®] (2 %)

Fa. Bayer, Leverkusen

Geräte:GerätFirma, Firmensitz

Auflichtmikroskop Diavert

Fa. Leitz, Wetzlar

Auflichtmikroskop Eclipse TS100-F
(inkl. Phasenkontrast-Einrichtung)

Fa. Nikon GmbH, Düsseldorf

Ausschwingrotor JS-7,5

Fa. Beckman, München

Autoklav

Fa. Integra Biosciences GmbH, Fernwald

Brutschränke

Fa. Memmert, Biel-Benken

Fa. Binder GmbH, Tuttlingen

Digitalkamera Nikon Coolpix 4500

Fa. Nikon GmbH, Düsseldorf

Durchlichtmikroskop Ortholux II

Fa. Leitz, Wetzlar

Eismaschine

Fa. Ziegra, Isernhagen

Elektrophoresekammern für Proteingele

Fa. Biometra, Londorf

<u>Gerät</u>	<u>Firma, Firmensitz</u>
FireBoy	Fa. Integra Biosciences GmbH, Fernwald
Feinwaage	Fa. Mettler Vertrieb Waagen Strathausen, Albach
Festwinkelrotor JA-10	Fa. Beckman, München
French [®] Pressure Cell	Fa. Sopra GmbH, Büttelborn
Gefriertruhen	Fa. Bosch Vertrieb Elektro Grün, Gießen
Geltrockner	Fa. BioRad, München
GeneQuant [®]	Fa. Pharmacia LKB Biochrom Ltd., Cambridge, GB
Isolator	Fa. Charles River Deutschland GmbH, Kißlegg
Kühlschränke	Fa. Privileg + Bosch Vertrieb Elektro Grün, Gießen
pH-Meter	Fa. WTW, Weilheim
Photometer DU 640	Fa. Beckman, München
Pipetten	Fa. Eppendorf, Hamburg
Magnetrührer	Fa. Jahnke & Kunkel GmbH & Co. KG, Staufen
Mehrkanalpipetten	Fa. BIOHIT Deutschland GmbH, Köln
Sterilbank	Fa. Heraeus, Hanau
Schüttelinkubatoren	Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel
SORVALL Zentrifuge RC 5B	Fa. Du Pont Company, USA
Spannungsgeräte	Fa. BioRad, München
	Fa. Pharmacia, Freiburg
Spektralphotometer	Fa. Beckman, München
Taumler	Eigenbau der Institutswerkstatt, IHIT, Gießen
Tischzentrifuge 5415 C	Fa. Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 5403 mit Ausschwingrotor	Fa. Eppendorf, Hamburg
Überkopfmischgerät	Fa. Elektro Grün, Gießen
Ultraschallgerät Branson Sonifier B-12	Fa. Branson Stuart, Vertrieb: Fa. Heinemann, Schwäbisch-Gmünd
Vortex	Fa. peQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen

GerätFirma, Firmensitz

Waage

Fa. Bosch Vertrieb Elektro Grün, Gießen

Fa. Kern, Albstadt

Western-Blotkammer

Fa. Pharmacia, LKB Biochrom Ltd.

Cambridge, GB

Zentrifuge J2-21

Fa. Beckman, München

Verbrauchsmaterialien:MaterialienFirma, Firmensitz

Centricon-Röhrchen YM-10

Fa. Millipore, Eschborn

Deckgläschen (Ø 12 mm)

Fa. Assistent, Sondheim

Einmalküvetten

Fa. MAGV, Rabenau

Filter

Fa. Millipore, Eschborn

Kanülen

Fa. Braun, Melsungen

Fa. Servoprax[®] GmbH, Wesel

96-well-Mikrotiterplatten

Fa. Nunc GmbH & Co. KG, Biebrich

Objektträger

Fa. MAGV, Rabenau

Parafilm[®]Fa. American National CanTM,
Greenwich, USA

Petrischalen

Fa. nerbe plus GmbH, Luhe

Pipettenspitzen

Fa. Ratiolab GmbH, Dreieich

Fa. BIOHIT GmbH, Köln

Polyolefin-Klebefolie

Fa. Nunc GmbH & Co. KG, Biebrich

Polystyrolröhrchen

Fa. Greiner Labortechnik GmbH,
FrickenhausenProtran[®] Nitrocellulose Transfer Membran

Fa. Schleicher & Schuell, Dassel

Reaktionsgefäße (1,5/2,0 ml)

Fa. Eppendorf, Hamburg

Reaktionsgefäße (15/50 ml)

Fa. Greiner Labortechnik GmbH,
FrickenhausenServapor[®] Dialyseschlauch (1,6 cm)

Fa. Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg

Spritzen

Fa. transcoject[®], Neumünster

Vierkantflaschen

Fa. Schott, Mainz

Zellkulturflaschen nach Roux

Fa. Schott, Mainz

Computerprogramme

Programm

Microsoft® Office 97

LASERGENE®

Anbieter

Fa. Microsoft Corporation, USA

Fa. DNASTAR LTD., USA

Plasmidkarten

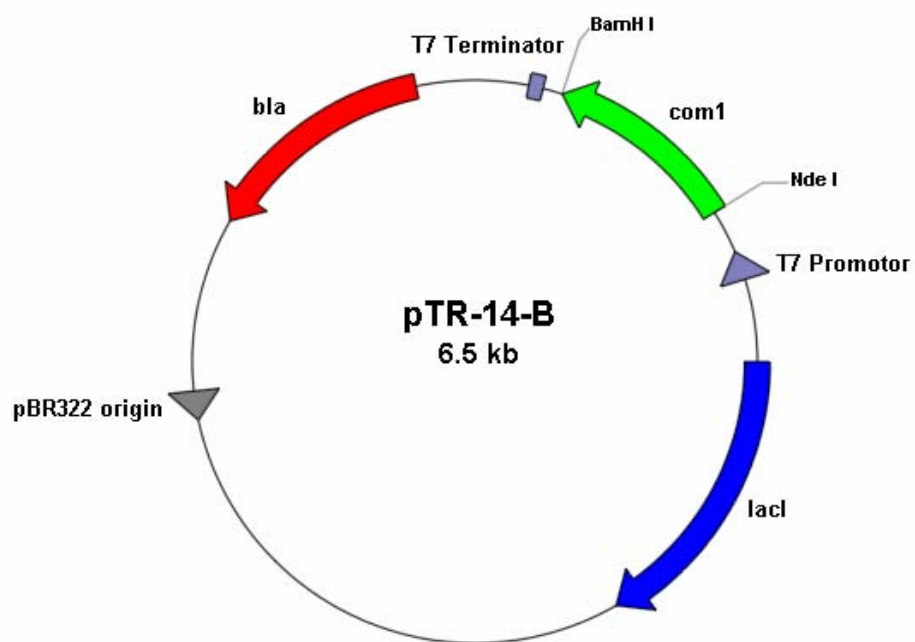


Abbildung 19: Karte des Plasmids pTR-14-B.

Das 759 bp große Insert *com1* wurde in den Vektor pET15b kloniert.

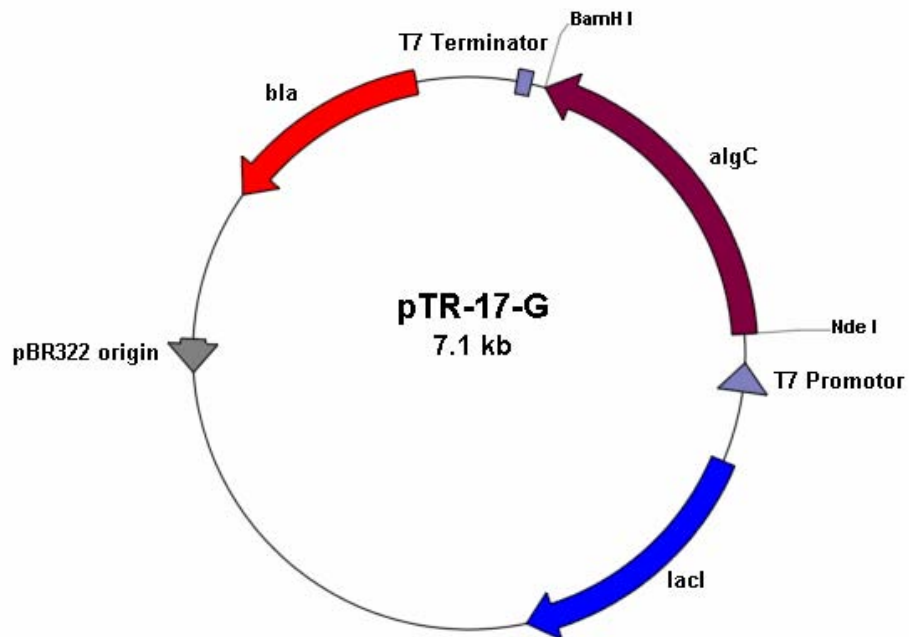


Abbildung 20: Karte des Plasmids pTR-17-G.

Das 1.371 bp große Insert *algC* wurde in den Vektor pET15b kloniert.

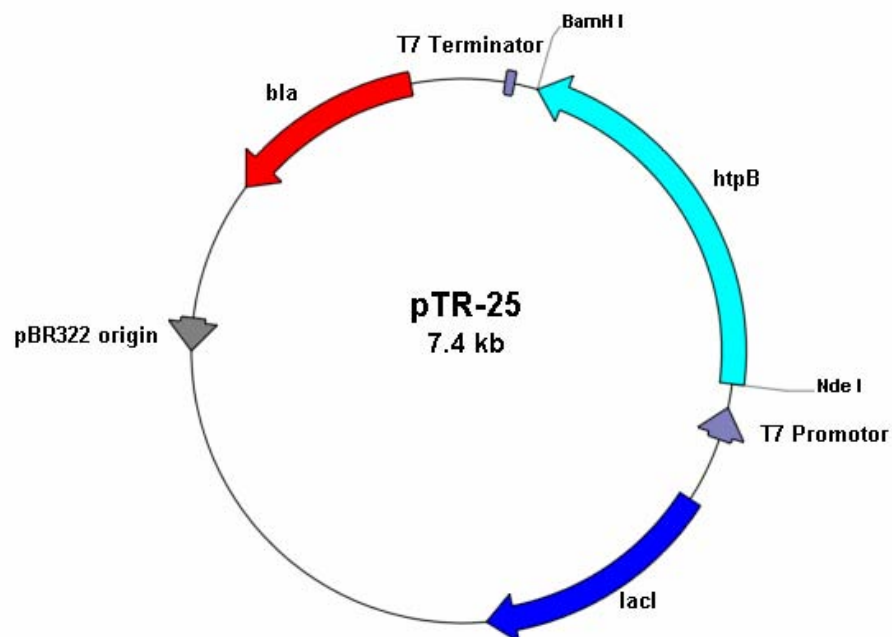


Abbildung 21: Karte des Plasmids pTR-25.

Das 1.659 bp große Insert *htpB* wurde in den Vektor pET15b kloniert.

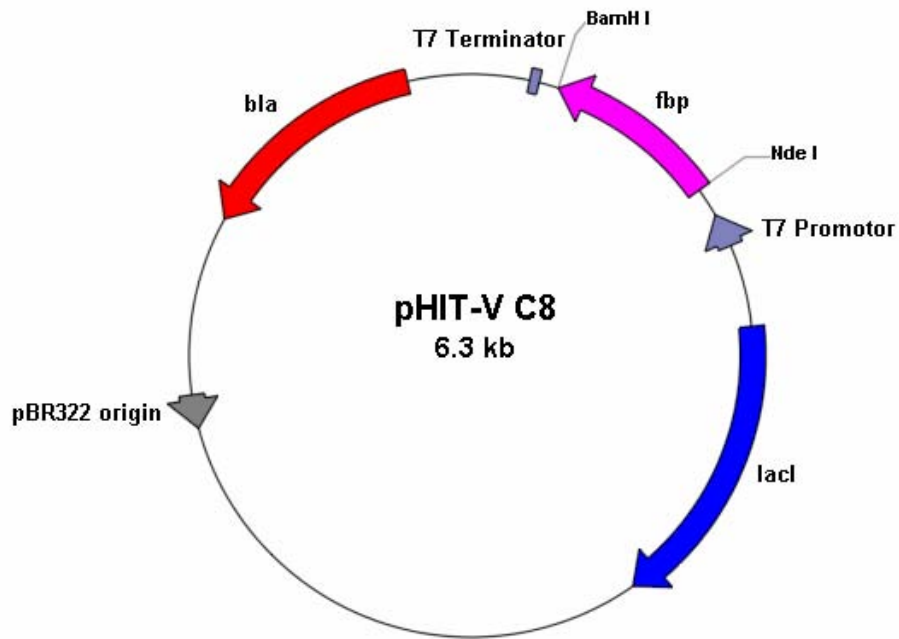


Abbildung 22: Karte des Plasmids pHIT-V C8.

Das 621 bp große Insert *fbp* wurde in den Vektor pET15b kloniert.

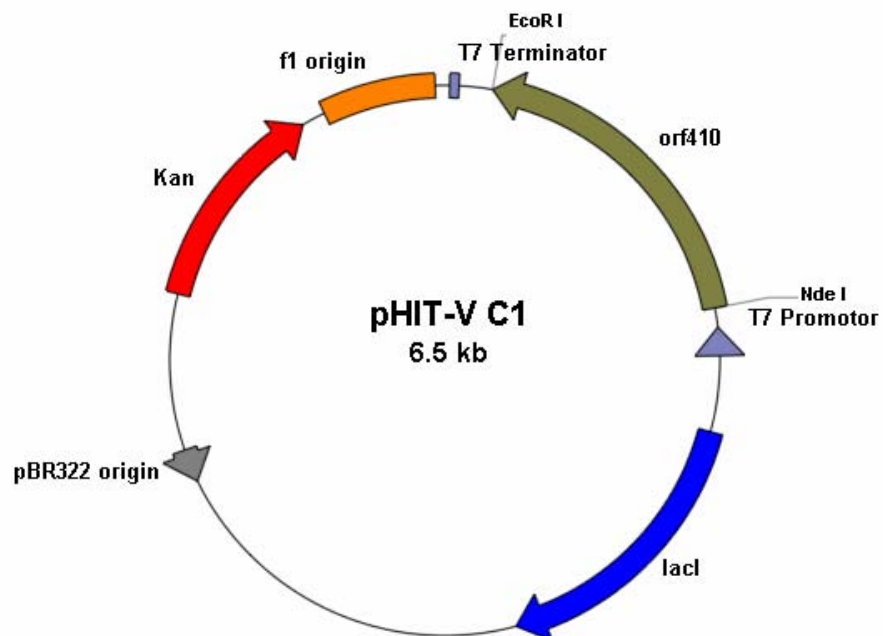


Abbildung 23: Karte des Plasmids pHIT-V C1.

Das 1.233 bp große Insert *orf410* wurde in den Vektor pET24b(+) kloniert.

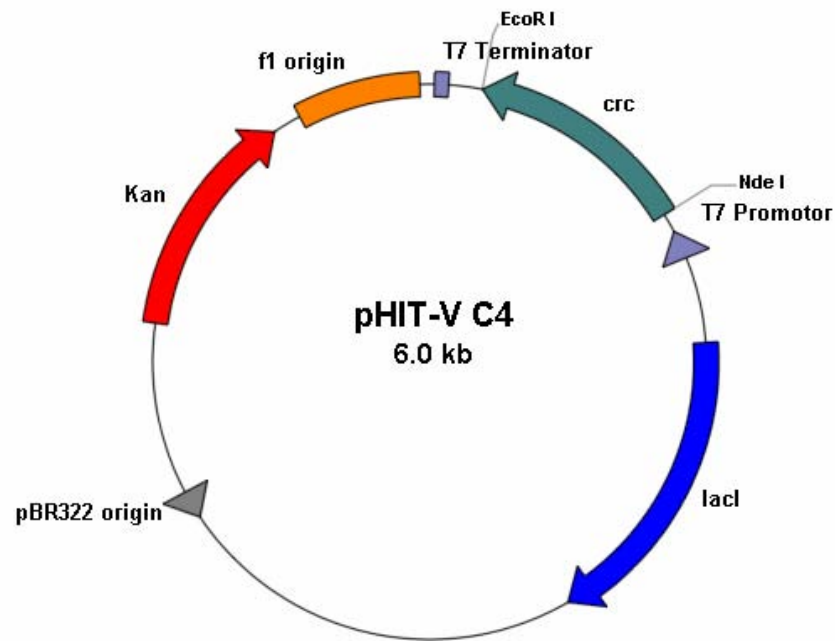


Abbildung 24: Karte des Plasmids pHIT-V C4.

Das 780 bp große Insert *crc* wurde in den Vektor pET24b(+) kloniert.

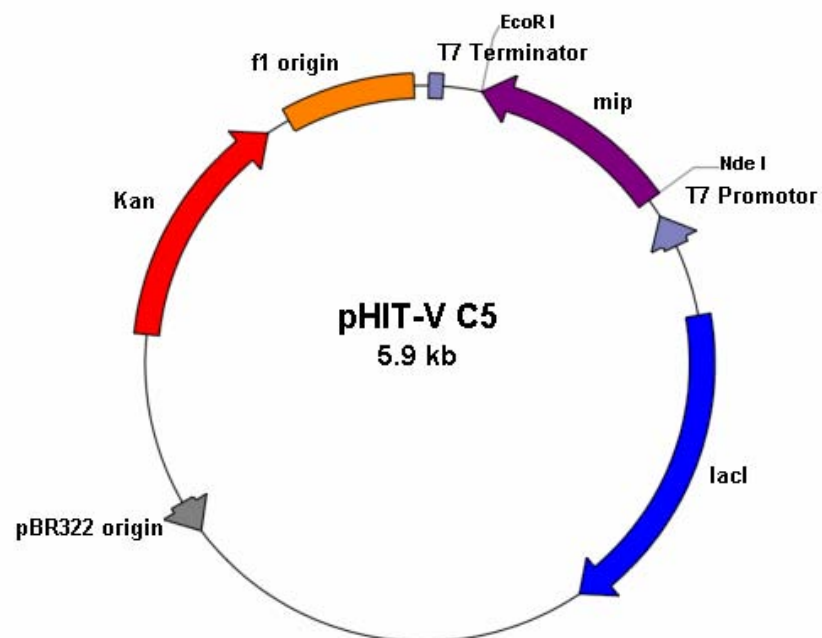


Abbildung 25: Karte des Plasmids pHIT-V C5.

Das 693 bp große Insert *mip* wurde in den Vektor pET24b(+) kloniert.

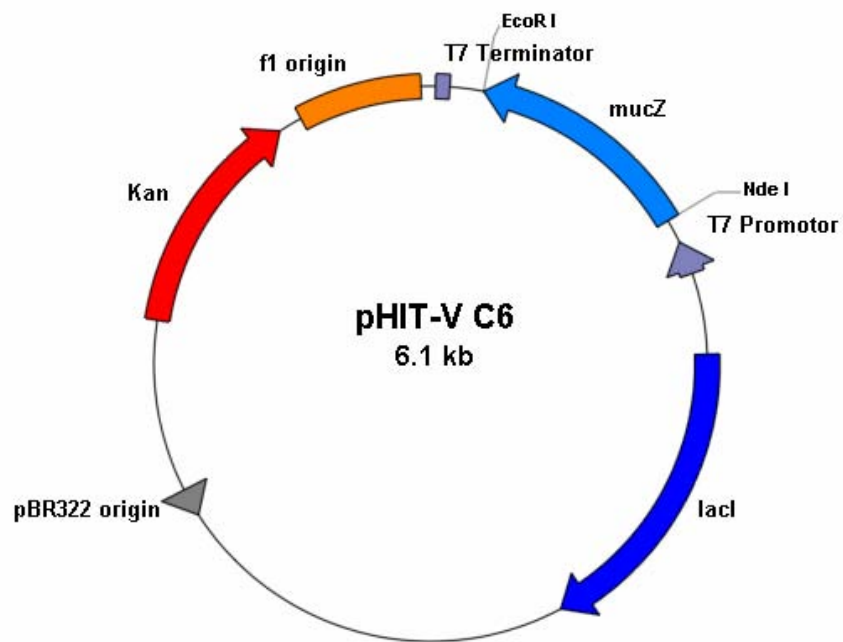


Abbildung 26: Karte des Plasmids pHIT-V C6.

Das 813 bp große Insert *mucZ* wurde in den Vektor pET24b(+) kloniert.

Danksagung

Am Schluss möchte ich mich bei den Personen bedanken, die es mir erst ermöglicht haben, diese Arbeit zu verfassen, indem sie mich während der letzten Jahre tatkräftig unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer für die Bereitstellung des Themas, die Betreuung der Arbeit, den zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz sowie die großzügige Überlassung der für diese Promotion benötigten Mittel. Vielen Dank auch für die anregenden Diskussionen während meiner Zeit am Institut sowie das Interesse an meinem beruflichen Werdegang.

Des weiteren gilt ein besonderes Dankeschön meiner Betreuerin Judith Tyczka, die nicht nur in beruflichen, sondern auch in privaten Angelegenheiten stets Ansprechpartnerin und Freundin war und ist. Ihr umfangreiches Wissen und die daraus resultierenden Anregungen haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Die enge Zusammenarbeit hat zudem mein Interesse an der Mikrobiologie weiter verstärkt. Und trotz der späteren räumlichen Distanz, hatte sie stets Zeit für Diskussionen und was nicht zu vergessen ist, für sehr umfangreiche und zeitaufwendige Korrekturen.

Dem Geschäftsbereich Animal Health Business Group der Bayer AG, Monheim, danke ich für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des Stipendiums zur Doktorandenförderung.

Den Mitarbeitern der Sanitätsakademie der Bundeswehr in München danke ich für die Hilfe bei der Quantifizierung des Gehaltes an *C. burnetii*-spezifischer DNA in murinen Organproben mittels TaqMan-PCR.

Vielen Dank auch den Mitarbeitern des Institutes für Medizinische Mikrobiologie des Universitätsklinikum Gießen, für die Unterstützung im Rahmen der Sequenzierungen.

Außerdem möchte ich den Mitarbeitern meiner ehemaligen Arbeitsgruppe: Birgit Schmidt, Uschi Leidner und Julia Heimbach einen Dank sagen. Sie standen mir immer tatkräftig zur Seite und unterstützten mich in jeder Hinsicht. Also Danke, denn es ist nicht selbstverständlich unter Arbeitskollegen Freunde zu finden. Ein ganz besonderes Andenken aus dieser Arbeitsgruppe gilt Rosi Frank, die ich nicht nur beruflich, sondern auch privat kennen und schätzen lernen durfte. Sie wird mir immer ein Vorbild sein.

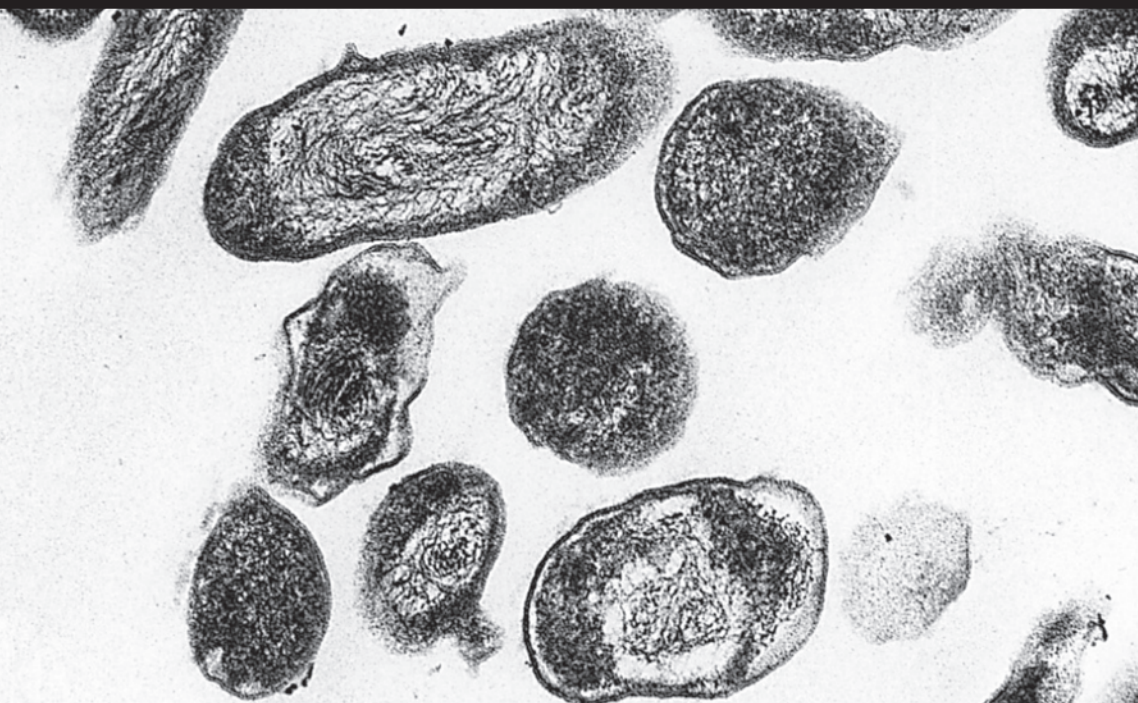
Zudem möchte ich mich bei allen Doktoranden herzlich für eine sehr schöne und angenehme Zusammenarbeit bedanken. Auch die vielen gemeinsamen Zusammentreffen außerhalb des Institutes werden mir in sehr guter Erinnerung bleiben, da sie letztlich das Leben auch in schweren Zeiten versüßten. Und dir Steffi zusätzlich danke, für die vielen entspannenden Waldläufe während und nach der Arbeitszeit. Danach konnte man über vieles wieder klarer denken.

Ebenso geht ein riesiges Dankeschön an alle nicht namentlich genannten Mitarbeiter des Institutes, denn sie waren es schließlich, die ein gutes und kollegiales Arbeitsklima schufen.

Ich danke auch all meinen Freunden, die sowohl für den fachlichen als auch emotionalen Beistand gesorgt haben.

Und am Ende kommen bekannter weise die Menschen, denen man im Grunde nie genug danken kann. So möchte ich meinem Bruder Jan Eberling und meinen Großeltern danken, die mich stets seelisch und moralisch unterstützt haben. Vielen Dank auch an meinen Mann Markus für seine uneingeschränkte Unterstützung und den Verzicht auf viel gemeinsame Freizeit. Und zu guter letzt gilt ein ganz besonderer Dank meinen Eltern Johann und Beate Eberling für Ihre bedingungslose Unterstützung während des Studiums und der Promotion, für ihr Verständnis und ihr Interesse an meinen beruflichen Werdegang. Ohne sie wäre dies alles nicht möglich gewesen und ich niemals dort, wo ich mich heute befinde. DANKE

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5237-4



9 178383510952379 ①